



**ANA Lúcia Miranda
Teixeira**

**Peptidómica viral salivar: aplicação em tumores da
cabeça e pescoço**



**Ana Lúcia Miranda
Teixeira**

**Peptidómica viral salivar: aplicação em tumores da
cabeça e pescoço**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Métodos Biomoleculares, realizada sob a orientação científica do Doutor Francisco Manuel Lemos Amado, Professor Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e do Doutor Rui Miguel Pinheiro Vitorino, Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.

Dedico este trabalho ao Helder, aos meus pais e ao meu irmão.

o júri

presidente

Prof. Doutor Pedro Miguel Dimas Neves Domingues
Professor auxiliar do departamento de Química da Universidade de Aveiro

Prof. Doutora Maria João Garrett Silveirinha de Sottomayor Neuparth
Professora coordenadora do Instituto Politécnico da Saúde do Norte

Prof. Doutor Francisco Manuel Lemos Amado
Professor auxiliar do departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutor Rui Miguel Pinheiro Vitorino
Investigador Auxiliar do departamento de Química da Universidade de Aveiro

agradecimentos

Quero expressar um agradecimento especial ao meu orientador, Doutor Francisco Manuel Lemos Amado, pelas horas infindáveis de paciência e compreensão dedicadas, sempre no sentido de impulsionar o crescimento espiritual, pessoal, intelectual e profissional; pela busca incessante de lapidar e despertar qualidades nas pessoas ao seu redor. Permanece como referência, um exemplo de vitória, sabedoria e de vida para mim.

Ao Doutor Rui Miguel Pinheiro Vitorino pelos seus ensinamentos e incansável acompanhamento e ajuda ao longo de todo o trabalho laboratorial e escrita da dissertação. Também pela sua amizade e generosidade que me servem de inspiração.

À Doutora Rosário Domingues e ao Doutor Pedro Domingues, pelo apoio e ânimo.

Aos colegas do laboratório de espectrometria de massa, Catarina, Cláudia Cristina, Miguel, Rita Ferreira, Sofia Guedes, Renato Alves, Armando Caseiro, Ana Isabel, Ana Reis e Zita pelo apoio, incentivo e boa disposição

Aos meus familiares e amigos, que desde sempre me incentivaram a alcançar este objectivo.

Um especial agradecimento aos meus pais, ao meu irmão, à minha cunhada, à minha sempre amiga Susana e ao meu namorado pelos exemplos de honestidade e determinação, educaram-me e ensinaram-me os valores éticos humanos ao longo da vida. Estas pessoas que com firmeza guiaram-me e incentivaram-me a prosseguir com humildade, respeito e perseverança. Meu eterno agradecimento, a vocês, que mesmo com dificuldades e a saudade não pouparam esforços para a realização deste sonho....

A Jesus Cristo, fonte de vida e salvação para o mundo. Dedico a ti senhor, por ter derramado sobre mim suas bênçãos, e permitir esta vitória na minha vida, pois "Tudo posso Naquele que me fortalece" (Filipenses 4,13)

"Não é do desafio que define quem somos, nem o que somos capazes de ser, mas como enfrentamos o desafio: podemos incendiar as ruínas ou construir, através delas e passo a passo, um caminho que nos leva à liberdade"
(Richard Bach)

"O valor das coisas não está no tempo em que elas duram, mas na intensidade com que acontecem. Por isso existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis".
(Fernando Pessoa)

Enfim, para todos aqueles que contribuíram directa ou indirectamente para mais esta vitória da minha vida.

palavras-chave

Saliva, cancro, peptidoma, vírus

resumo

A saliva é um fluido composto principalmente por 99,5% de água, 0,3% de proteínas e 0,2% de substâncias inorgânicas.

Existe um interesse crescente na aplicação da proteómica/peptidómica para o estudo de doenças infecciosas, nomeadamente no estudo do papiloma vírus humano (HPV) cujo desenvolvimento está relacionado com alguns carcinomas espinocelulares, como por exemplo, tumores da cabeça e pescoço. Contudo, o sistema imunológico reage de alguma forma à presença deste vírus. O objectivo deste trabalho consiste na identificação de proteínas virais na saliva e também a identificação de espécies virais de indivíduos com cancro da cabeça e pescoço. A caracterização peptidómica viral da saliva envolveu a acidificação da amostra com igual volume de TFA. A análise desta foi efectuada utilizando como ferramenta peptidómica o nano-HPLC MS e o MALDI-TOF/TOF.

Foram identificados 16 vírus, sendo alguns pertencentes à família do herpesvírus humano, três tipos de HPVs entre outros, como o vírus feline sarcoma.

Os vírus correspondentes ao papiloma vírus humano correspondem ao carcinoma da pele, o que nos leva a crer que como os indivíduos estão mais imunodeprimidos podem desencadear outro tipo de vírus. Posso assim concluir que esta técnica é eficaz para a detecção de vírus na saliva.

keywords

Saliva, cancer, peptidomic, viruses

abstract

The saliva is a fluid composed mainly of 99.5% water, 0.3% protein and 0.2% of inorganic substances.

There is a growing interest in applying proteomics / peptidómica for the study of infectious diseases, particularly in the study of human papilloma virus (HPV) whose development is associated with some squamous cell carcinoma, such as tumors of the head and neck. However, the immune system reacts to some extent the presence of this virus. The aim of this work is the identification of viral proteins in saliva and the viral species identification of individuals with cancer of the head and neck. The characterization of viral peptidómica involved the acidification of the saliva sample with an equal volume of TFA. The analysis was done using this tool as peptidómica the nano-HPLC and MALDI-TOF/TOF MS.

Viruses 16 were identified, with some belonging to the family of human herpesvirus, three types of HPV among others, as the feline sarcoma virus.

Viruses related to human papilloma virus is the carcinoma of the skin, which leads us to believe that as more individuals are immunocompromised may trigger another type of virus. I therefore conclude that this technique is effective for the detection of virus in saliva.

Índice

I. Introdução	- 3 -
1.1. O cancro.....	- 3 -
1.2. Tumores da cabeça e pescoço.....	- 3 -
1.3. Papel viral.....	- 5 -
1.4. Factores de risco associados ao tumor da cabeça e pescoço.....	- 6 -
1.4.1. Papiloma vírus humano.....	- 6 -
1.4.1.1. Propriedades gerais do papiloma vírus humano	- 6 -
1.4.1.2. HPV e Carcinogénese	- 9 -
1.5. Tabaco.....	- 13 -
1.6. Álcool	- 14 -
2. Metodologia aplicada para identificação de vírus na saliva.....	- 15 -
2.1. A proteómica/peptidómica	- 15 -
2.2. Proteómica Viral.....	- 19 -
3. Objectivos.....	- 26 -
II. Material e métodos.....	- 29 -
1. Descrição e caracterização da amostra	- 29 -
1.1. Preparação e colecta de saliva.....	- 29 -
1.2. Nano-HPLC.....	- 30 -
1.3. Espectrometria de massa	- 30 -
1.4. Pesquisa nas bases de dados	- 30 -
III. Resultados.....	- 33 -
IV. Discussão	- 47 -
V. Conclusão.....	- 51 -
VI. Referências bibliográficas.....	- 55 -
VII. Anexo	- 55 -
Blast das proteínas identificadas	- 64 -

Lista de figuras

Figura 1. Distribuição anatómica de locais e sublocais do tumor da cabeça e pescoço (adaptado de www.elements4health.com e journal.paho.org).....	4
Figura 2: Estrutura representativa do papilomas vírus humano (HPV) adaptado de (Steben and Duarte-Franco 2007)	6
Figura 3: Organização genómica de alto risco do HPV-31. Os ORFS primitivos estão indicados a preto, enquanto que os genes capsídeos estão a cinza. Os promotores precoce e tardio estão indicados por setas adaptado de (Longworth and Laimins 2004).	7
Figura 4: Epitélio não afectado (imagem da esquerda) e epitélio contaminado por HPV mostrando a várias camadas e produção diferenciadas do virião	8
Figura 5: Ciclo celular mediado pelas actividades normativas das proteínas Rb, HDAC, e E2F/DP-1 (adaptado de (Longworth and Laimins 2004)).	11
Figura 6: Produtos da infecção por EBV na célula humana, produção de EBER, EBNA e LMPs na infecção latente e expressão de BZLF-1 e LMP-1 no ciclo lítico (adaptado de www.scielo.br).	21
Figura 7: Função da p53 no controlo da proliferação. A p53 mutada ou inactiva leva à transformação maligna. (adaptado de www.scielo.br).....	24
Figura 8: Viriões HIV (http://upload.wikimedia.org)	25
Figura 9: Viriões de Herpesvírus (adaptado de www.oralgen.lanl.gov)	25
Figura 10: Sequência primária do Epstein-Barr nuclear antigen 2 OS=Epstein-Barr virus (strain B95-8) GN=EBNA2 PE=1 SV=1 (indivíduo 2- cor verde, indivíduo 5- cor vermelha e indivíduo 6- cor azul).....	36
Figura 11: Sequência primária do Viral myc transforming protein OS=Avian myelocytomatosis virus MC29 GN=MYC PE=3 SV=2 (indivíduo 6- cor azul).	37
Figura 12: Sequência primária do Neurovirulence factor ICP34.5 OS=Human herpesvirus 1 (strain CVG-2) GN=RL1 PE=3 SV=1 (indivíduo 3- cor de rosa).	37
Figura 13: Sequência primária do Probable proteína E4 OS=Human papillomavirus type 5b GN=E4 PE=4 SV=1 (indivíduo 2- cor verde, indivíduo 5- cor vermelha e indivíduo 6- cor azul).....	37
Figura 14: Sequência primária do Probable proteína E4 OS=Human papillomavirus type 47 GN=E4 PE=4 SV=1 (indivíduo 2- cor verde, indivíduo 5- cor vermelha e indivíduo 6- cor azul).....	38

Figura 15: Sequência primária do Probable protein E4 OS=Human papillomavirus type 5 GN=E4 PE=4 SV=2 (indivíduo 2- cor verde, indivíduo 5- cor vermelha e indivíduo 6- cor azul). 38

Figura 16: Sequência primária GTP binding protein lepA OS=Cytophaga hutchinsonii (strain ATCC 33406 NCIMB 9469) GN=lepA PE=3 SV (indivíduo 4-cor amarelo torrado). 38

Figura 17: Sequência primária do Probable nuclear antigen OS=Suid herpesvirus 1 (strain Kaplan) PE=4 SV=1 (indivíduo 5- cor vermelha indivíduo 6- cor azul, indivíduo 6- cor azul, indivíduo 7- cor roxo, indivíduo 8- cor laranja e indivíduo 9- cor castanho). 41

Figura 18: Sequência primária do Uncharacterized protein L291 OS=Acanthamoeba polyphaga mimivirus GN=MIMI_L291 PE=4 SV=1 (indivíduo 4-cor amarelo torrado) 41

Figura 19: Representação das proteínas encontradas em função dos indivíduos e dos péptidos sendo FS- Felina sarcoma vírus; HC- citomegalovírus Humano; AP- Acanthamoeba polyphaga mimivírus; HPV5- Papilomavírus Humano tipo 5; EBV- Epstein-Barr vírus; HPV47- Papilomavírus Humano tipo47; HPV5B- Papilomavírus Humano tipo 5b; AC- Autographa californica nuclear po; HH1- Herpesvírus Humano 1; FJ- Flavobacterium johnsoniae; SH1- Herpesvírus Suid 1 e AM- vírus Avian mielocitomatosis 44

Lista de tabelas

Tabela 1: Dados histológicos dos doentes	33
Tabela 2: Nome dos vírus identificados através do blast nos indivíduos com tumor e respectivas homologias	34
Tabela 3: Proteínas existentes nos indivíduos saudáveis e nos indivíduos com tumor....	42

Lista de abreviaturas

ACN- acetonitrilo

BSA -Albumina de soro bovino

DNA- Ácido desoxirribonucleico

E6- refere-se ao gene ou à proteína E6 do papiloma vírus humano

E7- refere-se ao gene ou à proteína E7 do papiloma vírus humano

G1- é o intervalo pós-mitótico e pré-síntese do DNA

HNSCCs - Carcinomas epidermóides da cabeça e pescoço

HPLC -Cromatografia líquida de alta pressão

HPV- Papiloma vírus humano

LCR- região de controlo longo

LC- Cromatografia líquida

MALDI- ionização por desorção por laser assistida pela matriz

MALDI-TOF/TOF- Espectrómetro de massa tipo duplo TOF com fonte de MALDI

MS -Espectrometria de massa

MS/MS -Espectrometria de massa tandem

NCR- região não codificante

ORF- sequência de leitura aberta

p53- refere-se à proteína p53 e ao gene p53

pRb- proteína retinoblastoma

S- refere-se à fase do ciclo celular na qual ocorre a síntese do DNA

RNA- Ácido ribonucleico

TA- Temperatura ambiente

TFA- Ácido trifluoroacético

TOF- Tempo-de-vôo

TOF/TOF- Tempo-de-vôo tandem

I – INTRODUÇÃO

I. Introdução

1.1. O cancro

O cancro é o termo usado para designar mais de 100 doenças diferentes, que apresentam em comum o crescimento desordenado de células anormais que possuem capacidade de invadir tecidos e de se espalhar para outras regiões do corpo através dos vasos sanguíneos e sistema linfático.

As células envelhecem, morrem e são substituídas por novas células. Por vezes, o ciclo celular, que normalmente ocorre de forma controlada, pode ocorrer de forma descontrolada. Quando o crescimento celular ocorre de forma descontrolada o organismo produz novas células sem reconhecimento de fronteiras, processo designado por crescimento neoplásico. Este conjunto de células extra forma um tumor. Nem todos os tumores que surgem num organismo são cancerígenos. Os tumores podem ser benignos ou malignos tomando a designação de cancro no último caso. Os tumores benignos raramente põem a vida em risco, de um modo geral, podem ser removidos e, muitas vezes, regredem. As células dos tumores benignos não metastizam para os tecidos que se encontram à sua volta ou para outras partes do organismo. Os tumores malignos podem ser removidos, embora possam voltar a crescer. As células dos tumores malignos podem invadir e danificar os tecidos e órgãos circundantes podendo ainda libertar-se do tumor primário e entrar na corrente sanguínea ou no sistema linfático - este é o processo de metastização das células cancerígenas, a partir do cancro original (tumor primário), formando novos tumores noutros órgãos (adaptado de www.roche.pt).

1.2. Tumores da cabeça e pescoço

Os tumores de cabeça e pescoço englobam um grupo de tumores biologicamente similares provenientes do trato digestivo superior, incluindo os lábios, a cavidade oral, a língua, a cavidade nasal, os seios paranasais, a faringe, a laringe e a orofaringe como apresentado na figura 1. A maioria dos tumores da cabeça e pescoço ocorrem no revestimento da mucosa (epitélio) designando-se por carcinomas espinocelulares. Normalmente este tipo de tumores difunde-se pelos nódulos linfáticos do pescoço, sendo que frequentemente a primeira vez que se manifestam é no momento do diagnóstico (HAMDAN 2007).

O cancro da cabeça e pescoço (HNSCC) é uma doença cancerígena típica de indivíduos fumadores, existindo ainda o risco de desenvolvimento de outros cancros directamente atribuídos à duração e intensidade da exposição ao tabaco (Singh 2008). O cancro de células escamosas da cabeça e pescoço é uma doença significativa em termos populacionais, compreendendo cerca de 5% de todos os tumores dos indivíduos dos Estados Unidos, tendo uma proporção ainda maior a nível mundial, mas este termo

define um grupo heterogêneo de neoplasias malignas, envolvendo subsítios semelhantes com diferentes factores de risco e patologia (Termine, Panzarella et al. 2008). Apesar de nos últimos 30 anos se terem observado avanços significativos no tratamento de tumores da cabeça e pescoço, poucos progressos se têm notado na melhoria das taxas de sobrevivência, uma vez que devido à localização destes tumores muitas vezes são descobertos em fases muito avançadas (Wadsworth, Somers et al. 2004). Cerca de 5% do HNSCC é desenvolvido em indivíduos não fumadores e que não bebem álcool. Além disso, as estatísticas mostram que há uma tendência para o aumento da incidência de HNSCC em indivíduos não fumadores. No entanto, uma percentagem significativa pode estar relacionada com a infecção do papiloma vírus humano (HPV) (Sturgis and Cinciripini 2007).

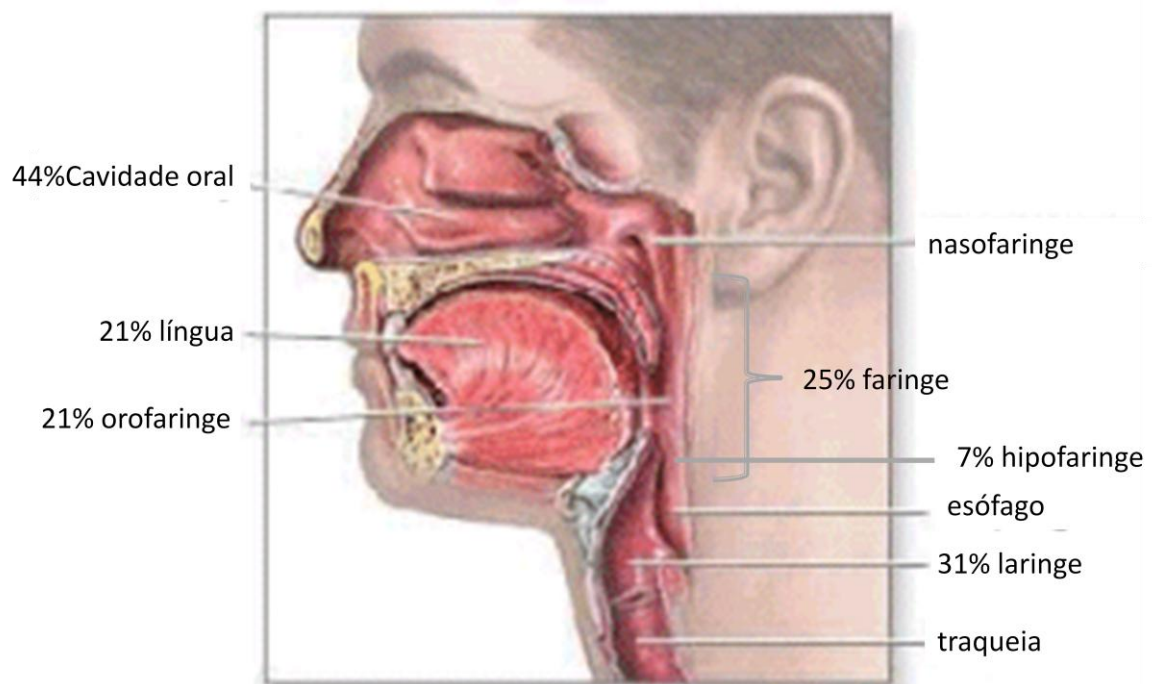


Figura 1. Distribuição anatómica de locais e sublocais do tumor da cabeça e pescoço (adaptado de www.elements4health.com e journal.paho.org)

Existem vários factores de risco que estão envolvidos no desenvolvimento do carcinoma espinocelular. Não há um agente ou factor causador isolado, claramente definido ou aceite, mas existem factores extrínsecos e intrínsecos que podem estar relacionados com a sua actividade. Como factores intrínsecos podemos ter alterações genéticas, e imunossupressão; e como factores extrínsecos podemos ter deficiências nutricionais, raios solares, fumo, álcool, e alguns vírus que têm sido apontados como possíveis agentes etiológicos (Bouda, Gorgoulis et al. 2000; Uobe, Masuno et al. 2001; Iamaroon, Pattanaporn et al. 2004). Em relação à etiologia viral, o papiloma vírus humano (HPV) é o vírus mais comumente citado na literatura como envolvido na carcinogénese oral (Miller

and Johnstone 2001; Scully 2005). A acumulação de alterações genéticas induzidas por agentes químicos, físicos e infecciosos, incluindo a activação ou supressão de oncogenes e genes supressores tumorais, leva ao desequilíbrio do ciclo celular originando danos no DNA celular e perda do controlo do ciclo da divisão da célula (Nagpal and Das 2003).

Embora o fumo e o álcool sejam factores etiológicos bem estabelecidos na carcinogénese oral, apenas um pequeno número de utilizadores desses produtos desenvolve o cancro. Este facto desperta a possibilidade de um possível envolvimento de outros factores agindo de forma sinérgica. O HPV pode actuar como um desses factores, potencializando o desenvolvimento de neoplasia maligna com origem no epitélio de revestimento (P syrri and DiMaio 2008).

1.3. Papel viral

A etiologia multifactorial do cancro tem sido amplamente aceite. Para além do papel dos factores de risco ambientais e/ou factores genéticos, uma etiologia infecciosa tem vindo a ser defendida.

O equilíbrio entre a proliferação e a morte celular (apoptose) é de vital importância para a sobrevivência de qualquer organismo vivo. Este equilíbrio pode ser quebrado por uma infecção viral, que pode culminar numa transformação neoplásica. Têm sido desenvolvidos produtos genéticos de origem viral que se podem ligar a esses genes reguladores da proliferação e da morte celular alterando as suas funções. O sinal inicial da apoptose pode ser inibido por proteínas de adenovírus (E1B 19 kDa e E3), mixomavírus (MT2), bacilovírus (iap), herpes vírus simplex e citomegalovírus, e inibido por mixomavírus ou vírus da hepatite C. Como consequência, as células do hospedeiro com infecção viral latente são conduzidas à proliferação sem regulação por reparação celular ou mesmo por mecanismos de eliminação de células danificadas. Essas células podem continuar a acumular mutações induzidas por outros mecanismos capazes de causar danos no DNA, como o tabaco, o álcool, agentes carcinogénicos, toxinas, entre outros, o que pode resultar numa neoplasia maligna (Venturi 2004).

1.4. Factores de risco associados ao tumor da cabeça e pescoço

1.4.1. Papiloma vírus humano

1.4.1.1. Propriedades gerais do papiloma vírus humano

Os papilomas vírus humano (HPVs) (figura 1) são vírus ubíquos de DNA que contêm uma proteína externa (capsídeo) e uma molécula circular única de cadeia dupla (Scully, Prime et al. 1985; zur Hausen 1996; zur Hausen 1999). Medem aproximadamente 55 nm de diâmetro, sendo o DNA viral associado com proteínas semelhantes a histonas e encapsulado por 72 subunidades (capsômeros) (Chang, Syrjanen et al. 1991; zur Hausen 1996; Doorbar 2005).

O genoma do HPV é composto por 8000 pares de bases, sendo que somente uma das cadeias de DNA é transicionalmente activa, sendo assim, toda a informação genética viral está localizada numa das cadeias de DNA (Chang, Syrjanen et al. 1991; zur Hausen 1996; de Villiers, Fauquet et al. 2004).

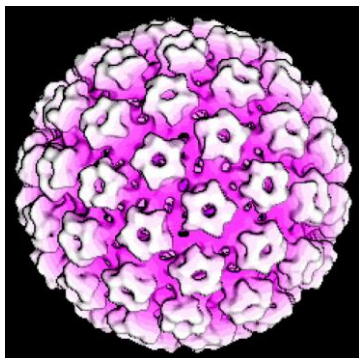


Figura 2: Estrutura representativa do papilomas vírus humano (HPV) adaptado de (Steben and Duarte-Franco 2007)

O genoma deste vírus pode ser dividido em três regiões: uma região de controlo longo (LCR), as regiões precoces (E) designadas de E1-E7e, região tardia (L) dividida em L1 e L2 (zur Hausen 1996; Villa 1997). A sequência entre o final de L1 e o começo de E6 é chamada de região de controlo longo (LCR), também conhecida como não codificante (NCR), representando 10 a 15% do genoma viral (Chang, Syrjanen et al. 1991; zur Hausen 1996). Um dos elementos presentes nas LCRs dos HPVs é a sequência de origem de replicação (ORI). Essa região provavelmente representa a origem da replicação do DNA do HPV (Barzal-Nowosielska, Miasko et al. 2001). As outras duas regiões (E e L) são funcionalmente activas, cada uma contendo diversas sequências de

leitura aberta (ORF) que codificam as proteínas virais (Chang, Syrjanen et al. 1991; Sugerman and Shillitoe 1997).

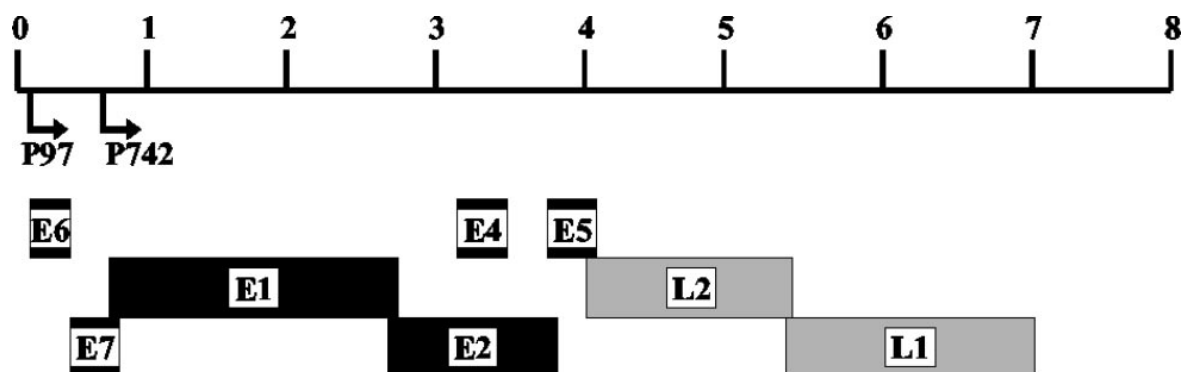


Figura 3: Organização genômica de alto risco do HPV-31. Os ORFS primitivos estão indicados a preto, enquanto que os genes capsídeos estão a cinza. Os promotores precoce e tardio estão indicados por setas adaptado de (Longworth and Laimins 2004).

As regiões precoces (E) representam aproximadamente 45% do genoma viral, sendo expressas logo após a infecção (Chang, Syrjanen et al. 1991; zur Hausen 1996; Sugerman and Shillitoe 1997). As regiões E1 e E2 codificam proteínas envolvidas na transcrição e na replicação do DNA viral, enquanto que os oncogenes E5, E6 e E7 modulam o processo de transformação celular (de Villiers, Fauquet et al. 2004). As proteínas codificadas por E2 actuam diferentemente na expressão dos genes virais e representam os maiores reguladores intragenómicos. A deleção na região de leitura aberta (ORF) E2 é frequentemente observada em biopsias de cancros cervicais, especulando-se que a mesma facilita a transformação das células humanas bem como a progressão para o estado de malignidade (zur Hausen 2000). Além do seu papel regulatório transcricional, a proteína E2 interage com a E1 estimulando a replicação do DNA viral e aparentemente facilitando a ligação da proteína E1 à origem da replicação. A E1 também interage com a DNA polimerase α , sendo uma proteína essencial para a replicação do HPV (zur Hausen 1996). A amplificação do genoma viral requer a expressão de todos os produtos dos seus genes, incluindo E4 e E5, cujos papéis na replicação ainda não estão completamente elucidados (Doorbar 2005). Do ponto de vista da transformação celular, as regiões E5, E6 e E7 são as de maior importância (zur Hausen 2000; Scully 2002; Doorbar 2005).

De acordo com o potencial de risco de desenvolvimento de neoplasias malignas em humanos, a Agência Internacional para a pesquisa do Cancro, em 1997, classificou os HPVs 16 e 18 como carcinogénicos em humanos (grupo 1), os HPVs 31 e 33 como provavelmente carcinogénicos em humanos (grupo 2A), e alguns dos tipos remanescentes de HPV como, possivelmente carcinogénicos em humanos (grupo 2B) (Sugerman and Shillitoe 1997). Outra classificação amplamente utilizada quanto ao

potencial de malignidade classifica os HPVs de baixo risco (6, 11), intermediário (31, 33, 35) ou de alto risco de malignidade (16, 18)(de Villiers 1989; Greer, Wheeler et al. 1995).

Como referido em 2008 por *Psyrrí et. al* juntos, estes dois tipos de HPV (HPV16 e HPV 18) são responsáveis por cerca de 70% dos casos do cancro cervical, e outros tipos de HPV de alto risco são responsáveis por praticamente todos os restantes casos desta doença (Psyrrí and DiMaio 2008). Apesar de infecção pelo HPV não estar geralmente envolvida no cancro da cabeça e pescoço, há evidências que indicam que pelo menos um subconjunto de câncros orais são HPV-positivos (Begum, Cao et al. 2005).

O HPV tipo 16 está associado a cerca de 90% dos tumores orais considerados HPV-positivos (Smith, Ritchie et al. 2004). Muitos dos câncros estão na fase oral da faringe, incluindo a base da língua, o palato mole e as amígdalas. Em geral, os tumores HPV-positivos tendem a ter uma morfologia basalóide, tendo menores probabilidades de expressar mutações da proteína retinoblastoma (Rb) ou de p53 susceptíveis ao p16 (Hoory, Monie et al. 2008).

Os papilomas vírus humanos são vírus epiteliotrópicos que infectam epitélios cutâneos e mucosos, produzindo vários tipos de neoplasias epiteliais (figura 4) tanto benignas como malignas, sendo que a única diferença é que nas neoplasias epiteliais malignas temos integração na célula hospedeira (Flaitz and Hicks 1998; Scully 2002; Steben and Duarte-Franco 2007).

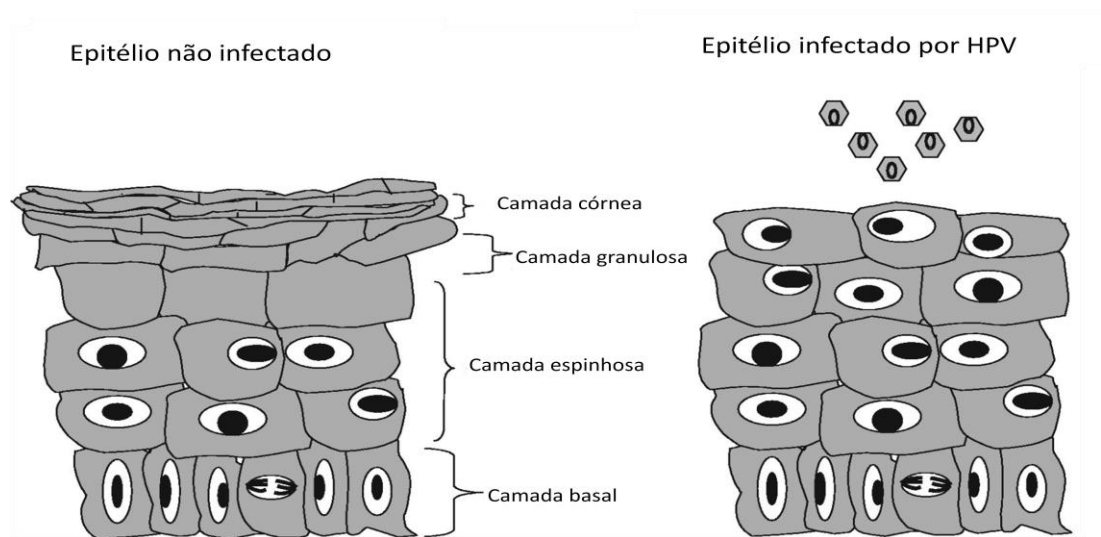


Figura 4: Epitélio não afectado (imagem da esquerda) e epitélio contaminado por HPV mostrando a várias camadas e produção diferenciadas do virião

O HPV tem sido implicado numa variedade de doenças anogenitais e aerodigestivas, que vão desde as verrugas até ao papiloma laríngeo ou cancro cervical. Estes vírus infectam a célula na camada basal do epitélio escamoso e revelam uma marcada pluralidade de genótipos (zur Hausen 2000). Actualmente, cerca de 130 tipos já foram identificados(Remmerbach, Brinckmann et al. 2004; Doorbar 2005; Scully 2005), sendo

que na cavidade oral 24 destes estão associados a lesões benignas (HPVs 1, 2, 3, 4, 6, 7, 10, 11, 13, 16, 18, 30, 31, 32, 33, 35, 45, 52, 55, 57, 59, 69, 72 e 73) e 12 (HPVs 2, 3, 6, 11, 13, 16, 18, 31, 33, 35, 52 e 57) a lesões malignas. O HPV inicialmente infecta os queratinócitos basais, penetrando pela via mucosa lesada. A replicação do HPV está relacionada directamente com a diferenciação epitelial (Doorbar 2005).

Na transmissão sexual, qualquer trauma, que pode ocorrer durante o acto sexual, permite que o vírus penetre nas células da camada basal. Nestas células, a replicação do DNA viral, bem como a transcrição de todos os genes e formação do capsídeo ocorre somente nas células das camadas superficiais (Sugerman and Shillitoe 1997). As partículas virais maduras (com capsídeos completos) estão, portanto, ausentes nas células basais e a replicação reprodutiva do HPV está restrita às células nos estratos espinhoso e granuloso (Chang, Syrjanen et al. 1991; McMurray, Nguyen et al. 2001; zur Hausen 2002).

Os vírus multiplicam-se exclusivamente no núcleo das células infectadas. Com isso, as neoplasias associadas ao HPV estão normalmente confinadas aos locais onde a infecção teve início. Outro facto importante é que o genoma do HPV replica-se como epissomo (não-integrado) nas lesões benignas e pré-invasivas, mas ele é integrado no DNA celular na maioria dos cancros (Barzal-Nowosielska, Miasko et al. 2001). Entretanto, a integração do HPV no DNA do hospedeiro não foi observado no cancro oral (Sugerman and Shillitoe 1997; Zhang, Sdek et al. 2004).

1.4.1.2. HPV e Carcinogénese

Existem dois possíveis papéis para o HPV no cancro, sendo um deles a presença da expressão dos genes virais precoces e o outro é o dano genético causado pela integração do DNA viral (Barzal-Nowosielska, Miasko et al. 2001). Contudo, segundo *Sugerman, Shillitoe* (1997) a infecção por HPV pode representar um estágio para a carcinogénese, mas a presença continuada do HPV não é requerida para o desenvolvimento da neoplasia. Também, *Sugiyama et al.* (2003) mencionaram que o HPV16 exerce um papel nos estágios iniciais da carcinogénese oral, especulando-se que este vírus actua como um indicador da proliferação celular, mas a sua presença não é um requisito para a progressão da doença. A importância da infecção pelo HPV na carcinogénese oral é fundamentada pela capacidade dos HPVs de alto risco imortalizarem queratinócitos orais *in vitro*. A imortalização pode envolver a desactivação de proteínas supressoras de tumores pré-formadas pelas oncoproteínas virais, o bloqueio da transcrição de genes supressores de tumores como resultado da inserção do oncogene do HPV, ou a estimulação da transcrição de um oncogene celular pela inserção de sequências activadoras de transcrição derivadas do HPV (Sugerman and Shillitoe 1997; Hoory, Monie et al. 2008).

As células epiteliais variam na sua susceptibilidade para imortalização *in vitro* por diferentes oncogenes dos HPVs. Alguns queratinócitos podem ser imortalizados por E6 do HPV16 individualmente, outros por E7 isoladamente, porém muitas células epiteliais

humanas requerem tanto a proteína E6 como a E7 para uma imortalização eficiente (Sugerman and Shillitoe 1997; Hebner and Laimins 2006). Os genes E6 e E7 mostram-se como os mais importantes para estimulação do crescimento e transformação celular. Ambos codificam proteínas multifuncionais, que tanto agem individualmente como cooperam sinergicamente para progressão do crescimento neoplásico (Villa 1997; zur Hausen 1999). A expressão da proteína E6 altera significativamente as funções celulares, incluindo indução de hiperproliferação, a inibição da apoptose e a alteração da actividade transcricional (Hebner and Laimins 2006).

A oncoproteína E6 do HPV é um polipeptídeo constituído por aproximadamente 150 aminoácidos, caracterizada pela presença de quatro segmentos Cys-X-X-Cys, os quais permitem a formação de duas pontes de zinco (zur Hausen 1996). Esses segmentos são estritamente conservados nas proteínas E6 em toda a família do HPV. Ainda não está claro se esses segmentos Cys-X-X-Cys são essenciais para permitir a ligação de E6 ao DNA da célula hospedeira (Rapp and Chen 1998). A proteína E6 do HPV possui várias propriedades biológicas importantes, de entre estas destaca-se a sua capacidade de ligação à proteína p53, a qual protege a integridade do genoma (zur Hausen 1996; Barzal-Nowosielska, Miasko et al. 2001; Scully 2002). A associação de E6 com a p53 é mediada por uma proteína celular adicional, denominada proteína associada a E6 (E6-AP). Uma vez estabelecida a associação a proteína E6 estimula a degradação da p53. Esse processo mediado pela proteína E6 requer ATP e envolve o caminho proteolítico ubiquitina-dependente. Essa ligação E6-p53 e posterior degradação da última impedem a acção supressora tumoral da p53 no núcleo celular, permitindo que as células afectadas falhem no bloqueio do ciclo celular em G1, perpetuando deste modo o dano no DNA celular (Sugerman and Shillitoe 1997; Summersgill, Smith et al. 2000). A integração da E6 com a p53 parece ser a principal causa da instabilidade cromossômica das células infectadas por HPVs de alto risco, contudo, a E6 também pode associar-se com outras proteínas apoptóticas afectando-as de forma directa, incluindo a Bak, a Bax, a p53, a CBO/p300, a E6-AP, a E6BP, (zur Hausen 1996; zur Hausen 2000; Doorbar 2005) e afecta indirectamente a actividade de outras, alterando a sua transcrição (hTERT e VEGF). A proteína E6 revela um marcado pleiotropismo na ligação com proteínas da célula hospedeira, interagindo com a proteína ligante de cálcio ERC55, com a proteína de adesão focal paxilina, e com a proteína GAP (E6TP1). Essas interacções podem produzir consequências funcionais nas células que expressam a E6 (zur Hausen 2000).

Um dos mecanismos oncogénicos principais utilizados pela proteína E6 na progressão maligna é a ruptura da actividade da p53. A proteína E6 pode aumentar a actividade da telomerase, outro factor envolvido na carcinogénese (zur Hausen 1999; McMurray, Nguyen et al. 2001; Scully 2002). Destaca-se que a capacidade da E6 para activar a telomerase não se correlaciona com a sua capacidade para degradar a p53 (Rapp and Chen 1998). Deste modo, a presença da proteína E6 é considerada um factor predisponente para o desenvolvimento de cancros associados ao HPV (Doorbar 2005).

A proteína E7 do HPV também desempenha um importante papel na carcinogénese, principalmente devido à sua capacidade de se ligar à proteína pRb, produto do gene supressor de tumor retinoblastoma (Rb) (Villa 1997; zur Hausen 2000; McMurray, Nguyen et al. 2001; Scully 2002; Doorbar 2005).

A oncoproteína E7 constitui uma fosfoproteína ligante de zinco composta por 98 aminoácidos contendo dois domínios Cys-X-X-Cys. Um domínio ligante de zinco e dois segmentos Cys-X-X-Cys que revelam similaridade com a proteína E6, sugerindo uma relação entre essas duas proteínas (zur Hausen 1996; Sugerman and Shillitoe 1997; Scully 2002). Acredita-se que isso resulta de uma única modificação na sequência de aminoácidos, especificamente aqueles localizados na posição 21 (zur Hausen 1996; McMurray, Nguyen et al. 2001).

A interacção da proteína E7 com a pRb já esta bem estabelecida. A pRb exerce um importante papel no ciclo celular, agindo como um regulador negativo deste. Ela liga-se aos membros da família dos factores de transcrição E2F, reprimindo a acção destes prevenindo, desse modo, a progressão da fase G1 para a fase S do ciclo celular. A E7 liga-se preferencialmente à pRb hipofosforilada e o complexo E7- pRb activa os factores de transcrição E2F, que são libertados da pRb, permitindo assim, a expressão de proteínas necessárias para a replicação do DNA (figura5) (Sugerman and Shillitoe 1997; Villa 1997; zur Hausen 1999; McMurray, Nguyen et al. 2001; Doorbar 2005).

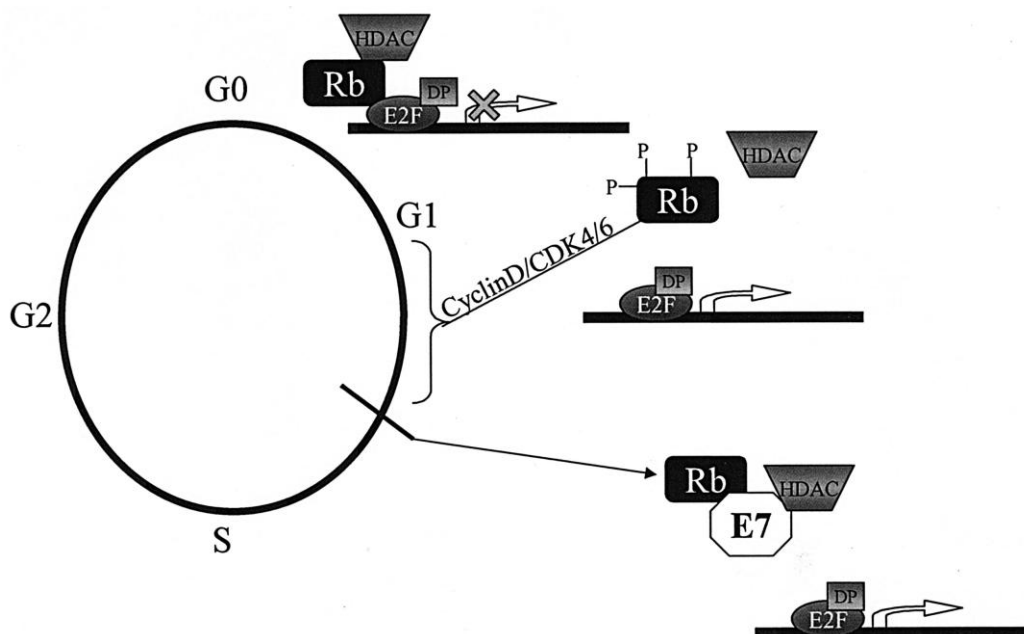


Figura 5: Ciclo celular mediado pelas actividades normativas das proteínas Rb, HDAC, e E2F/DP-1 (adaptado de (Longworth and Laimins 2004)).

A E7 também interage com várias proteínas, sendo muitas delas as que regulam o crescimento celular, como a deacetilase da histona-1 (HDAC-1), a RB, a p107, a p130 e componentes da família dos factores de transcrição AP-1, bem como as ciclinas e as CDKs (Narisawa-Saito and Kiyono 2007) (zur Hausen 1999; McMurray, Nguyen et al. 2001; Doorbar 2005). Destaca-se ainda uma importante função da E7, que é a inactivação dos inibidores das cinases ciclina-dependente p21 e p27. As interacções de E7 com esses inibidores desregulam a actividade das ciclinas e cinases ciclina

dependente (CDK), sendo um grande factor na estimulação do crescimento das células infectadas pelo HPV (zur Hausen 2000). Portanto, esse somatório de associações provavelmente contribui para a habilidade da E7 em induzir a proliferação, imortalização e transformação celular (McMurray, Nguyen et al. 2001).

Além das proteínas E7 e E6, outras oncoproteínas podem estar envolvidas na carcinogénese, de entre elas, aponta-se a proteína E5 (Sugerman and Shillitoe 1997; Villa 1997; zur Hausen 2000).

A E5 do HPV é uma pequena proteína da membrana, constituída por 84 aminoácidos, cuja principal função biológica parece estar relacionada com os factores de crescimento, os quais apresentam as suas actividades exacerbadas nas infecções pelo HPV (McMurray, Nguyen et al. 2001). As proteínas E5 formam complexos com uma variedade de outras proteínas transmembranares, tais como o receptor de crescimento epidérmico (EDFr), o receptor do factor de crescimento derivado da plaqueta- β e o receptor do factor estimulante de colónia 1. Aquela proteína também se liga às proteínas do complexo de junção Gap, como a proteína ligante da membrana trifosfatase da adenosina (ATPase) (zur Hausen 2002).

De acordo com os relatos de *Villa et al.* (2002), a proteína E5 é tradicionalmente conhecida por interagir com o domínio transmembranar do receptor para EGF. Em células expressando E5, o turnover e a fosforilação dos referidos receptores estão aumentados, possivelmente reforçando a resposta positiva para a sinalização do crescimento celular. Considerando que o EGF é um factor necessário para o crescimento dos queratinócitos humanos, presume-se que a actividade da proteína E5 está relacionada com a estimulação das células através das fases G1 e S do ciclo celular, sugerindo que essa proteína exerce um papel complementar no processo de imortalização das células (McMurray, Nguyen et al. 2001).

Porém, tem sido observado em células de carcinoma cervical, que o ORF E5 frequentemente sofre deleção, indicando que a E5 participa nos estágios iniciais da infecção do HPV, mas que esta não é essencial para a manutenção do fenótipo maligno das células infectadas (zur Hausen 2002).

O ORF E4 é traduzido longitudinalmente a partir de transcrições como uma fusão com os primeiros 5 aminoácidos de E1 para gerar a fusão de proteínas E1 ^ E4. O ORF E4 carece de um codão iniciador AUG e usa o início da sequência de tradução de E1.

Todos os papilomavírus expressam proteínas E1 ^ E4 na fase tardia do ciclo viral, mas têm apenas uma sequência homóloga limitada das proteínas E1 ^ E4 de alto risco associados com redes de queratina nas células e, quando estão sobre-expressas em ensaios transiente-transfecção, podem induzir o seu colapso (Doorbar, Ely et al. 1991).

Isto sugere um papel viral para E1 ^ E4, facilitando a saída, mas em infecções naturais de alto risco apenas uma quantidade limitada de colapso tem sido observado. As proteínas HPV E4 de alto risco podem também desempenhar um papel na regulação da expressão do gene, uma vez que eles interagem com uma helicase do RNA, E4-DBD, que é um

membro de uma família envolvida em helicase mRNA splicing, transportadores bem como a iniciação da tradução (Yoshioka, Inoue et al. 2000).

Foi demonstrado que a subre-expressão de HPV-11 e HPV-1 nas proteínas E1 ^ E4 induz uma detenção G2, numa variedade de tipos de células (Davy, Jackson et al. 2002) . Ele não deixa claro qual o papel E1-E4 ^ ciclo celular induzida prisão desempenha no ciclo de vida produtiva, mas pode ser para contrariar os efeitos da E7, que actua para empurrar as células na fase S.

A participação do HPV na patogénese oral e orofaríngea foi proposto pela primeira vez por *Syrjanen et al.* e, em seguida, apoiada por vários outros autores, com base nos seguintes elementos: (i) a natureza da epiteliotrófica do HPV, (ii) o potencial oncogénico amplamente confirmado de alto risco nas doenças patogénicas neoplásicas anogenital, especialmente cervicais de carcinoma e (iii) as semelhanças morfológicas entre orofaríngeos e epitélios genitais (Termine, Panzarella et al. 2008).

Além da forte associação entre a infecção por HPV e carcinoma cervical, levando a evidências epidemiológicas, moleculares e clínicas indicam que o elevado risco de HPVs (especialmente HPV-16) contribui para o desenvolvimento de cancro da cabeça e pescoço em alguns indivíduos que não têm factores de risco comuns para esta doença (isto é, história de consumo de álcool e tabaco) (Pyrri and DiMaio 2008). Segundo um estudo epidemiológico, a incidência anual de câncros na base da língua e das amígdalas nos E.U.A. aumentaram 2,1% e 3,9%, respectivamente, de 1973 a 2001 entre os homens e mulheres com idades compreendidas entre os 20-44 anos, enquanto noutros locais as incidências diminuíram (Frisch, Hjalgrim et al. 2000).

1.5. Tabaco

Foi demonstrado pela primeira vez em 1964 que o tabaco é um factor causal em vários tumores humanos, responsáveis por mais de 30% de todos os câncros mortais em todo o mundo. A gama de câncros com maior incidência em fumadores inclui o cancro do pulmão, o cancro da cabeça e pescoço, do esófago, da bexiga, do rim, do pâncreas, o cervical, e o cancro gástrico (Pirkle, Bernert et al. 2006). O centro de controlo de doenças estima que de 1997 a 2001, nos EUA, existiram 440.000 mortes prematuras por ano, devido ao tabaco. Durante estes anos foram gastos 75 biliões de dólares em tratamentos médicos e mais de 150 biliões de dólares, por ano, em perdas económicas relacionadas com a doença. Apesar de o mecanismo exacto permanecer pouco claro, o fumo do tabaco promove a tumorigénese por induzir aberrações genéticas. A taxa e a acumulação dependem de um balanço entre a dosagem carcinogénica e a susceptibilidade do hospedeiro (Ho, Wei et al. 2007).

Dos 4000 químicos encontrados no fumo do tabaco, cerca de 60 são carcinogénicos. Estes compostos pertencem aos grupos dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, aminas aromáticas heterocíclicas, aminas aromáticas, aldeídos, hidrocarbonetos aromáticos, n-nitrosaminas, entre outros. De entre os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, o benzo-alfa-pireno é o melhor caracterizado a nível da sua capacidade de

indução de tumores. A administração de hidrocarbonetos aromáticos e n-nitrosaminas a ratos também mostrou induzir tumores (Barzal-Nowosielska, Miasko et al. 2001).

O tabaco está associado à susceptibilidade do hospedeiro no aparecimento de HNSCC. Vários estudos têm sugerido que o risco para o desenvolvimento de HNSCC é herdado. Indivíduos com familiares de primeiro grau com cancro têm 2 a 14 vezes o risco aumentado de possuir HNSCC com a prática de fumar, embora dependa da dose (Ho, Wei et al. 2007). Uma vez absorvido, o processo de carcinogénese relacionado com o tabaco necessita de activação por enzimas celulares para promover a tumorigénese e os seus efeitos podem ser neutralizados por enzimas destoxificantes. Uma das enzimas mais estudadas é o citocromo P450, que contém três famílias de proteínas (CYP1, CYP2, e CYP3). Vários estudos e meta-análises sugerem que os polimorfismos podem afectar a função destas enzimas, tornando-as mais activas e, por sua vez, os indivíduos mais sensíveis ao fumo (Ho, Wei et al. 2007). O citocromo p450 1A1 (CYP1A1), foi o primeiro gene identificado do CYP e é o melhor estudado. Ele codifica para a hidroxilase benzo-alfa-pireno, que está envolvida na activação dos hidrocarbonetos policíclicos aromáticos a metabolitos DNA reactivos. Vários polimorfismos "activos" na região codificante do codão 461 e 462 e intrónicos, como por exemplo o intrão 7 e mRNA não codificante na região 30 do alelo associado ao local de restrição MspI têm revelado um aumento global do risco de HNSCC relacionado com tabaco. O risco relacionado com o uso de tabaco pode ainda ser maior quando presente em associação com polimorfismos que diminuem a actividade das enzimas destoxificantes (GSTM1) (Anantharaman, Chaubal et al. 2007).

O hábito tabágico, considerando também os fumadores passivos está relacionado com um aumento da incidência de vários tipos de cancro (Ho, Wei et al. 2007).

1.6. Álcool

O World Health Organization Global Burden of Disease Project estima que 1,8 milhões de mortes por ano podem ser atribuídas ao cancro associado ao consumo de álcool. Além do cancro da cabeça pescoço, tumores do esófago, do fígado, do colon-rectal e da mama estão epidemiologicamente associados ao consumo de álcool (Singh 2008). Tem sido sugerido que o consumo crónico de álcool aumenta o risco de cancro do tracto aerodigestivo superior em 2-3 vezes dependendo da dose (Pelucchi, Gallus et al. 2006; Seitz and Becker 2007). Além disso, existe um aumento "multiplicativo" do risco para indivíduos simultaneamente consumidores de álcool e fumadores de 10 a 20 vezes maior do que para indivíduos não fumadores e que não consomem álcool (Pelucchi, Gallus et al. 2006).

A actividade carcinogénica do álcool envolve mecanismos directos e indirectos (Seitz and Becker 2007). A exposição crónica ao álcool resulta num aumento da actividade do citocromo P450, podendo resultar num aumento da activação de agentes cancerígenos (tanto para o tabaco como para o álcool). Além disso, ele actua como um solvente, facilitando a entrada destes nas células, especialmente na parte superior do trato aerodigestivo. Os efeitos directos do álcool na carcinogénese exigem um metabolismo intermediário activo – o acetaldeído por acção do álcool desidrogenase (ADH), CYP2E1

(juntamente com espécies reactivas de oxigénio) ou da catalase. Na transformação do álcool, o acetaldeído, por sua vez, é convertido em acetato pela acetaldeído desidrogenase (ALDH). Os factores que afectam a acumulação de acetaldeído, incluindo o aumento do consumo de álcool, o metabolismo de álcool elevado e a diminuição ou conversão para acetato (activando polimorfismos em ADH1C), resultam num aumento das taxas de formação de cancro (Yokoyama and Omori 2003). Por exemplo, a deficiência de ALDH2, que é comum em asiáticos, aumenta o risco de formação do cancro do esófago até 16 vezes em relação aos indivíduos com níveis normais de ALDH2 (Lewis and Smith 2005). O acetaldeído que é derivado do metabolismo do álcool exerce os seus efeitos cancerígenos principalmente através da ligação ao DNA, mas também modifica a transferência de grupos metilo, resultando numa hipometilação em que, por sua vez afecta a transcrição de vários genes. As espécies reactivas de oxigénio geradas durante o metabolismo do álcool, têm também efeitos mutagénicos (Seitz and Becker 2007).

2. Metodologia aplicada para identificação de vírus na saliva

2.1. A proteómica/peptidómica

A proteómica tem como objectivo determinar a identidade das proteínas assim como a sua função e estrutura. A complexidade do proteoma é enorme, principalmente devido a processos como splicing alternativo, e vários eventos, incluindo clivagens proteolíticas e modificações pós-traducionais. Acredita-se que quase todas as proteínas sofrem de algum tipo de modificações pós-traducionais, e que existe mais de 300 modificações pós-traducionais diferentes (Kay, Barton et al. 2008).

A Proteómica, é uma área em grande expansão, que tem como objectivo o estudo sistemático da estrutura, função e interações dinâmicas das proteínas (Blackstock and Weir 1999). O ritmo do desenvolvimento é impelido pela integração de novas técnicas computacionais, métodos analíticos ainda mais sensíveis e avançados, abordagens genéticas e bioquímicas optimizadas para estudar sistemas biológicos. Em particular têm vindo a ser desenvolvidos, métodos quantitativos e qualitativos avançados para a análise de proteínas. (Yates, Gilchrist et al. 2005). A Proteómica permite uma melhor compreensão dos processos patológicos e do desenvolvimento de novos biomarcadores para diagnóstico e detecção precoce de doenças contribuindo para o desenvolvimento de novos medicamentos e desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. As áreas da proteómica que são particularmente promissoras incluem a determinação de alterações na expressão proteica, não só a nível das células ou tecidos, mas também em estruturas subcelulares e fluidos biológicos; o desenvolvimento de novos biomarcadores para o diagnóstico e detecção precoce da doença, bem como a identificação de novos alvos terapêuticos para o desenvolvimento potencial de novos medicamentos através de

estratégias mais eficazes na avaliação do efeito terapêutico e da toxicidade (Vertes 2008).

A maioria das amostras para análise proteómica são obtidas a partir de tecidos celulares ou de fluidos corporais. Para amostras de células, tanto métodos suaves como agressivos têm vindo a ser usados para a ruptura das células, com o objectivo de obter amostras para estudos proteómicos. Protocolos utilizados para a ruptura de células incluem lise osmótica (Bohring and Krause 1999), lise congelar-descongelar, lise com detergente e lise enzimática (Salazar and Asenjo 2007). Em geral, os métodos suaves são aplicados a células onde a lise ocorre facilmente como acontece nos glóbulos vermelhos. Os métodos mais duros incluem sonicação, pressão mecânica, trituração e homogeneização (Nandakumar and Marten 2002). Existem vários kits comerciais de extracção de proteínas para diferentes tipos de células. Em Proteómica, amostras a partir de fluidos corporais podem ser recolhidas, nomeadamente, a partir de sangue (soro ou plasma), urina, saliva, suor ou suco gástrico. São necessários diferentes procedimentos para a obter amostras para análise proteómica a partir de diferentes fluidos corporais (Chen 2008).

A Peptidómica é uma área que se baseia na caracterização do peptidoma através da análise qualitativa e/ou quantitativa global dos péptidos biológicos (Schulte, Tammen et al. 2005). Estes péptidos podem ser pequenas moléculas intactas, tais como hormonas, citocinas e factores de crescimento ou espécies resultantes de actividade proteolítica. Em fluidos biológicos, os péptidos dão-nos informação respeitante à síntese de proteínas, ao processamento e degradação. Uma vez que a quantidade e o tipo de péptidos na circulação sistémica muda dinamicamente de acordo com o estado fisiológico ou patológico de um indivíduo, é possível que a análise global do "peptidoma" pode levar à descoberta de novos biomarcadores ou a novos métodos de diagnóstico (Schrader and Schulz-Knappe 2001).

Recentemente, *Villanueva et al.* sugeriu uma nova forma de diagnosticar o cancro usando a análise peptidómica combinando com a espectrometria de massa usando um MALDI-TOF (Villanueva, Shaffer et al. 2006). O procedimento de *Villanueva et al.* tem muitas semelhanças com a técnica originalmente proposta por *Petricoin et al.* (Petricoin, Ardekani et al. 2002) mas é baseado em diferentes hipóteses. *Villanueva et al.* sugeriu que as informações diagnósticas fornecidas pela análise de péptidos, são originárias da actividade exproteolítica de fragmentos proteicos de alta abundância, principalmente gerados pela coagulação e pelo Sistema Complemento (Villanueva, Shaffer et al. 2006).

A saliva é geralmente descrita como um fluido heterogéneo composto por proteínas, glicoproteínas, electrólitos e pequenos compostos orgânicos e inorgânicos. A concentração proteica da saliva está dependente da produção das glândulas, da hora do dia, da dieta, da idade, do género e do estado da doença (Battino, Ferreira et al. 2002). Este fluido é composto principalmente por 99,5% de água, 0,3% de proteínas e 0,2% de substâncias inorgânicas (Humphrey and Williamson 2001; Van Nieuw Amerongen, Bolscher et al. 2004). Outras proteínas salivares (1-2 mg / ml) são entre outras a lactoferrina, as imunoglobulinas, a anidrase carbónica, a albumina, e uma vasta gama de

peptídeos que incluem cistatinas, staterinas, lisozimas, histatinas e uma ampla classe de peptídeos que contêm elevados níveis de prolina (35-40%), sendo designadas por proteínas ricas em prolina (PRPs) (Humphrey and Williamson 2001; Van Nieuw Amerongen, Bolscher et al. 2004; De Smet and Contreras 2005; Dodds, Johnson et al. 2005; Vitorino, Lobo et al. 2005; Schipper, Silletti et al. 2007) . A função biológica da maioria das proteínas da saliva continua por compreender, no entanto, a saliva apresenta uma variedade de proteínas, que se encontram unicamente neste fluido e que desempenham funções de particular importância para a saúde oral. As PRPs, compreendem cerca de 70% do conteúdo proteico total da saliva produzida pela glândula parótida humana, encontrando-se agrupadas em três grupos de acordo com a sua carga e grau de glicosilação: ácidas, básicas e básicas glicosiladas. As PRPs ácidas são proteínas multifuncionais, com domínios separados de ligação a bactérias e a hidroxiapatite e quando se encontram adsorvidas à superfície do dente, podem fornecer locais de ligação altamente específicos para determinadas bactérias presentes na cavidade oral (Dodds, Johnson et al. 2005; Vitorino, Lobo et al. 2005).

O restante conteúdo proteico da saliva produzida pela parótida é constituído na sua maioria por amilase, existindo no entanto outras proteínas como a lisozima, lactoferrina, peroxidase e IgA secretora, que apesar de se encontrarem em pequenas quantidades, estão relacionadas com a saúde oral. A lactoferrina em combinação com a peroxidase compreende um potente sistema inibidor de bactérias cariogénicas. A lactoferrina, uma proteína ligadora de ferro, tem a capacidade de captar íões ferro do ambiente oral necessários ao metabolismo bacteriano (Dodds, Johnson et al. 2005; Vitorino, de Moraes Guedes et al. 2006). Outra proteína presente na saliva é a staterina, que permite que a saliva mantenha o seu estado supersaturado no que respeita a sais de fosfato e cálcio. As staterinas fornecem ainda locais de ligação ao dente e à mucosa oral a uma variedade de microrganismos orais. Estas proteínas contribuem para a manutenção de uma dentição intacta, inibindo a precipitação espontânea do fosfato de cálcio (Dodds, Johnson et al. 2005). As mucinas, o maior componente orgânico da saliva submandibular e sublingual, são grandes glicoproteínas, constituindo dois grupos principais, o MG1 e o MG2. O grupo MG1 corresponde às mucinas de elevado peso molecular (10-30 MDa), codificado pelo gene *MUC5B* e agora designado por MUC5B. As mucinas de baixo peso molecular (~130 kDa), pertencem ao grupo MG2, produto de tradução do gene *MUC7*, agora designado de MUC7. O elevado grau de glicosilação e potencial de hidratação previne a desidratação e as suas propriedades viscoelásticas fornecem lubrificação. Estas glicoproteínas estão ainda envolvidas na ligação a toxinas, aglutinação de bactérias e são componentes importantes da película aderida (Van Nieuw Amerongen, Bolscher et al. 2004; Dodds, Johnson et al. 2005). Outro grupo de interesse de proteínas da saliva são as histatinas. Estas pequenas proteínas (3-5 kDa), básicas e ricas em histidina, encontram-se na saliva produzida pela parótida e pela submandibular. Uma característica interessante destas proteínas é o facto de possuírem actividade anti-cândida (Dodds, Johnson et al. 2005).

Estudos recentes da composição proteica salivar, recorrendo a técnicas de separação de proteínas como a electroforese bidimensional em gel de poliácridamida (2DE) e a cromatografia líquida (LC), seguidas de identificação das proteínas por espectrometria de

massa (MS), têm contribuído para o conhecimento do proteoma salivar, encontrando-se já identificadas 1381 proteínas salivares (Vitorino, Lobo et al. 2004; Wilmarth, Riviere et al. 2004; Hardt, Thomas et al. 2005; Hu, Xie et al. 2005; Xie, Rhodus et al. 2005; Guo, Rudnick et al. 2006; Walz, Stuhler et al. 2006).

Usando a proteômica e ensaios imunológicos, conseguiu-se recentemente identificar e validar 5 biomarcadores proteicos para a detecção de HNSCC, incluindo a proteína de ligação Mac-2, a catalase, calgranulina B, profilina e CD59 (Hu 2007). A saliva de indivíduos com HNSCC contém proteínas específicas, como alfa-TNF, IL-1, IL-6, IL-8, CD44, fibronectina, defensina-1, hialuronidase, telomerase, fragmento 19 da citoqueratina, polipéptidos antigénicos e o antígeno cancerígeno CA125, que poderão vir a ser usados como ferramentas para o diagnóstico destes câncros (Mizukawa, Sugiyama et al. 1999; Drake, Cazare et al. 2005).

A detecção precoce é a questão-chave em todos os tipos de cancro. No caso do HNSCC, se for detectado na fase 1 a taxa de sobrevivência a 5 anos é de 80%. Se for detectado em etapas mais tardias (fase 3 e fase 4) a taxa de sobrevivência varia de 20 a 40%. Diversos estudos preliminares mostraram o potencial das proteínas salivares para a detecção precoce deste tipo de cancro (HNSCC). O nível de certas citocinas proangiogénicas pró-inflamatórias, como alfa-TNF, IL-1, IL-6 e IL-8, aumenta significativamente na saliva de indivíduos com lesões orais pré-malignas (OPMLs), comparando com o grupo controlo. Estas citocinas são mais elevadas em indivíduos com HNSCCs, comparando com os indivíduos com OPMLs. Estes estudos sugerem que as citocinas inflamatórias dependentes de NF-kappaB terão potencial para virem a ser usadas no diagnóstico de forma a acompanhar-se a evolução da doença em indivíduos com lesões pré-malignas (Rhodus, Cheng et al. 2005; Tao, Huang et al. 2007).

A utilidade clínica destes biomarcadores tem sido limitada, até agora, devido a questões relacionadas com a precisão do método e a necessidade de validação desses possíveis biomarcadores, de preferência usando uma tecnologia diferente. Ao conceber um estudo de procura de biomarcadores, deveriam ser incluídos grupos com diferentes doenças em particular com natureza inflamatória, para além de um grupo de controlo saudável, para despiste de respostas sistémicas não necessariamente associadas ao cancro. Por exemplo, indivíduos com doença periodontal podem ser inscritos como um grupo controlo, a fim de testar o valor diagnóstico destas proteínas inflamatórias no HNSCC. Autoanticorpos de tumores específicos poderiam estar presentes na saliva humana na detecção de cancro. Por exemplo, o autoanticorpo p53 foi encontrado na saliva com uma correlação com os níveis séricos de HNSCC, podendo o acompanhamento dos níveis salivares de anticorpos para a p53 oferecer um método específico para a detecção de um subconjunto de HNSCC com aberrações da p53. Também o fraccionamento de glicoproteínas na saliva pode revelar-se uma abordagem promissora para a descoberta de biomarcadores de cancro. Por último, o desenvolvimento de ferramentas proteómicas, especialmente a marcação isotópica / MS e matrizes proteicas, representam avanços significativos. Estas tecnologias quantitativas exigem apenas pequenas quantidades de amostras clínicas para análise (Warnakulasuriya, Soussi et al. 2000).

No entanto, a identificação e a detecção de alterações na concentração de proteínas e péptidos por espectrometria de massa é limitada pela complexidade do proteoma da saliva (Kay, Barton et al. 2008).

2.2. Proteómica Viral

Existe um interesse crescente na aplicação da proteómica para o estudo de doenças infecciosas. Um factor impeditivo da terapia de doenças infecciosas é o desenvolvimento de resistência a drogas comumente utilizadas, o que reforça a necessidade de desenvolver novas terapias mais eficazes. A disponibilidade de toda a sequência de nucleótidos de uma série de genes de vírus tem proporcionado um quadro para a identificação de proteínas codificadas por estes genomas utilizando espectrometria de massa (MS) (Vertes 2008). A Proteómica aplica-se ao estudo da caracterização de proteomas subvirais (por exemplo, proteínas secretadas, proteínas de superfície, e proteínas imunogénicas), à análise comparativa dos diferentes estados fisiológicos, à identificação de proteínas relacionadas à patogenicidade e às interações com o hospedeiro, bem como na avaliação dos mecanismos de acção de terapias antivirais (Vertes 2008).

As infecções virais são uma causa significativa da morbilidade, incluindo cancro, imunossupressão, e consequentemente de mortalidade. Muito frequentemente, as infecções não são diagnosticadas numa fase inicial do seu desenvolvimento sendo apenas determinadas aquando do aparecimento de sintomas e, em vários casos, isso pode significar anos ou décadas após a infecção inicial. A capacidade para diagnosticar uma infecção ou um cancro antes do aparecimento dos sintomas pode ser de importância fundamental para um tratamento mais eficaz. A análise proteómica de soro tem sido proposta como um meio de diagnóstico de doenças infecciosas e / ou de diagnóstico precoce do cancro. O facto de os vírus poderem causar cancro foi estabelecido à quase 100 anos atrás, quando *Peyton Rous* demonstrou que sarcomas de frangos poderia ser transmitidos por um vírus que veio a ser conhecido como o vírus sarcoma *Rous* (Rous 1979). Em 1930 tornou-se evidente que os tumores de coelhos poderiam ser transmitidos por um vírus que é actualmente conhecido como o *Shope* papilomavírus (Shope RE 1933). De uma destas observações sobre animais vieram os campos da oncologia do RNA viral e da oncologia do DNA viral respectivamente, levando assim a perceber que muitos tumores humanos podem ser atribuídos a vírus (Shillitoe 2009). Normalmente, saber se na realidade um determinado vírus é realmente a causa de um tumor humano, não é uma resposta fácil. As características epidemiológicas dos vírus associados aos cancros são muito diferentes das características das infecções virais, como a poliomielite ou gripe, onde a transmissão e a prevenção estão muitas vezes ligados.

O citomegalovírus humano (HCMV) é o maior membro da família de herpesvírus humano. Após a infecção inicial, o HCMV permanece num estado latente no hospedeiro (Gandhi and Khanna 2004). A replicação do citomegalovírus na ausência de uma resposta imunitária eficiente é central na patogenicidade do mesmo. As complicações que se

observam em primeiro lugar são em indivíduos cujo sistema imunitário é imaturo ou está suprimido devido a tratamentos médicos, ou co-infecções com outros agentes patogénicos. Estimativas da capacidade de codificação do HCMV indicam que existam entre 160 a 200 regiões de leitura aberta (Prichard, Penfold et al. 2001). Estudos recentes usando a espectrometria de massa para determinar o proteoma viral sugerem que o número de proteínas virais pode ser ainda maior do que o proposto em estimativas anteriores (Britt and Boppana 2004). A análise das proteínas purificadas a partir do Virião do HCMV indicou que mais proteínas virais do que as 71 anteriormente descritas. Doze das proteínas identificadas foram codificadas por vírus ORFS conhecidos anteriormente não associado a viriões, e 12 proteínas virais eram ORFS originais (Varnum, Streblow et al. 2004).

O vírus Epstein-Barr (EBV) é um membro ubíquo da família do herpes vírus que está associado com uma variedade de linfomas e doenças linfoproliferativas (Ambinder 2003). Apresenta uma cadeia de DNA dupla e tem a capacidade de produzir uma infecção latente caracterizada por uma baixa expressão de genes virais e mínimos efeitos citopáticos ou de proliferação viral (Cruz, Van Den Brule et al. 2000; Sand, Jalouli et al. 2002). O EBV apresenta uma alta prevalência na população, com cerca de 90% dos adultos possuidores de anticorpos para o EBV, infectando geralmente linfócitos e células epiteliais (Cruz, Van Den Brule et al. 2000; Sand, Jalouli et al. 2002). É bem estabelecido como agente patológico do linfoma de Burkitt e do carcinoma nasofaríngeo (Maeda, Hiranuma et al. 1998; Gonzalez-Moles, Gutierrez et al. 2002; Sand, Jalouli et al. 2002). Este tipo de vírus codifica uma variedade de genes que dirigem a proliferação e que conferem resistência à morte das células (Cohen 1999). A infecção humana de linfócitos B com EBV induz linhas celulares proliferativas de B-linfoblastóides (LCLs) (Toda, Sugimoto et al. 2000). O EBV normalmente não se replica em linfócitos B recém-infectados. Nesses linfócitos B infectados, porém latentes, existe a expressão de seis proteínas nucleares diferentes ou EBNAs, duas proteínas de membrana diferentes ou LMP e dois pequenos filamentos de RNA ou EBERs. Estes produtos virais mantêm a latência e estimulam o linfócito em repouso a proliferar continuamente. O termo latência, ausência de infecção lítica, torna-se confuso e inadequado para o EBV, uma vez que na infecção por EBV no estado latente ocorre o crescimento e a proliferação celular, imediatos e eficientes. No entanto, apesar da presença de genomas e produtos virais, a proliferação do linfócito B infectado é similar àquela ocorrida pela acção de um antígeno, mitógeno ou IL-4. De qualquer maneira, no estado latente do EBV ocorre a proliferação da célula infectada, e não de partículas virais como ocorre na infecção lítica viral (Fields BN 1996). A latência pode ser directamente induzida para o ciclo lítico pela activação de BZLFB, uma proteína transativadora do EBV.

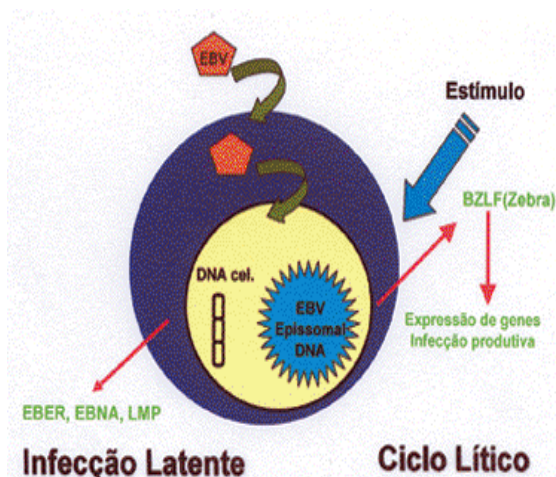


Figura 6: Produtos da infecção por EBV na célula humana, produção de EBER, EBNA e LMPs na infecção latente e expressão de BZLF-1 e LMP-1 no ciclo lítico (adaptado de www.scielo.br).

O ciclo lítico é caracterizado por uma intensa transcrição, replicação de DNA e pela produção de proteínas tardias como antígenos de capsídeos e glicoproteínas. A Leucoplasia Oral é uma doença causada por replicação focal, sendo a única manifestação *in vivo* da infecção replicativa do EBV (Fields BN 1996).

A proteína LMP-1 modula o crescimento e a diferenciação, induz a expressão de múltiplos marcadores de superfície celular, ativadores celulares, antígenos e moléculas de adesão (Maeda, Hiranuma et al. 1998; Gonzalez-Moles, Gutierrez et al. 2002). A LMP-1 reduz a resposta celular a sinais de diferenciação, aumenta a possibilidade de invasão da mesma na matriz colágena e pode transformar fibroblastos humanos em queratinócitos (Cruz, Van Den Brule et al. 2000). Pode ainda induzir resistência à apoptose através da activação de proteínas anti-apoptóticas como a Bcl-2 (Maeda, Hiranuma et al. 1998; Cruz, Van Den Brule et al. 2000). Estudos *in vitro* demonstram que a LMP-1 pode bloquear a apoptose mediada pela p53 em células epiteliais e em células de linfoma Burkitt (Maeda, Hiranuma et al. 1998; Gonzalez-Moles, Gutierrez et al. 2002). A expressão de LMP-1 em indivíduos imunodeprimidos pode induzir a transformação de linfócitos B e a aparição de processos linfoproliferativos (Gonzalez-Moles, Gutierrez et al. 2002).

No entanto, a prevalência de EBV varia muito de acordo com a região geográfica e as técnicas empregues (Cruz, Van Den Brule et al. 2000; Sand, Jalouli et al. 2002). Utilizando a PCR, técnica mais sensível, a prevalência giraria em torno de 37,9%, sem diferenças estatisticamente significativamente entre fumadores e não fumadores, consumidores de álcool e não consumidores de álcool (Sand, Jalouli et al. 2002).

Recentemente, perfis proteómicos das três LCLs foram analisados comparativamente com o início da tarde e as passagens da cultura celular. A fosfoproteína Stathmin foi identificada, e a sua expressão diminuiu significativamente com a imortalização de LCLs (Toda, Sugimoto et al. 2000).

A Stathmin é extremamente importante não só para a formação de um fuso mitótico normal a partir da entrada da mitose, mas também para a regulamentação da função do fuso mitótico nas fases posteriores à mitose (Toda, Sugimoto et al. 2000). Noutro estudo utilizando ionização por desorção por laser assistida pela matriz (MALDI-TOF), 20 proteínas de EBNA2 foram identificadas, 11 das quais foram dependentes de c-myc e, portanto, mais provavelmente associadas com a proliferação de células do hospedeiro (Schlee, Krug et al. 2004).

Estas descobertas aumentam a possibilidade de stress no papel das proteínas virais EBV (EBNA e LMP) na patogenicidade da doença. Contudo, quando as células infectadas com EBV são tratadas com 5-azacitidina (AZC), um agente que induz a expressão de genes silenciosos não há alteração da expressão de 21 polipeptídeos, enquanto que a expressão de 14 aumentou. Muitas das proteínas induzidas estavam envolvidas no metabolismo energético, organização de estruturas do citoesqueleto, da síntese proteica e da viabilidade celular. Assim, o efeito de medicamentos que activam genes supressores de tumores e o seu perfil proteómico após tratamento é de grande interesse (Shimakage, Horii et al. 2002).

Finalmente, um herpes vírus importante a considerar é o herpes simplex (HSV). O HSV tipo 1 e 2 são vírus omnipresentes que causam infecções em populações humanas em todo o mundo. As manifestações clínicas das infecções por HSV são variadas, indo desde assintomáticos com risco de vida a doença em recém-nascidos e hospedeiros imunodeprimidos (Kimberlin and Whitley 2005). O HSV-1 provoca infecções graves com indução de alterações do mecanismo transducional do hospedeiro, incluindo a fosforilação de algumas proteínas ribossomais e a progressiva associação de várias proteínas não ribossomais a ribossomas (Kawaguchi, Matsumura et al. 1999; Walsh and Mohr 2004). Usando uma abordagem proteómica, ficou demonstrado que as proteínas VP19C, VP26, e ICP27 estão associados com proteínas ribossomais (Greco, Bienvenut et al. 2001). Especificamente, o início imediato da proteína ICP27 associada ao início da tradução celular o factor que liga a proteína poli A (PABP), factor iniciador eucariota 3 (eIF3), e factor iniciador eucariota 4G (eIF4G) em células infectadas, resultando na estimulação da tradução de certos mRNAs virais e inibindo a tradução do mRNA (Fontaine-Rodriguez, Taylor et al. 2004). Outros têm demonstrado que aproximadamente 50 proteínas celulares e virais estão associadas com a ligação da proteína ao HSV-1 ICP9 DNA de cadeia simples, e alguns dos quais participam na reparação de DNA (Taylor and Knipe 2004), implicando que a infecção por HSV-1 resulta no controlo celular na reparação e replicação de DNA e na maquinaria de expressão de genes.

Análises proteómicas de vírus de RNA no que diz respeito ao diagnóstico e origem da detecção do biomarcador também são de grande interesse na comunidade médica. Por exemplo, a SRA é uma nova doença infecciosa que surgiu pela primeira vez na província do Guangdong, na China, em Novembro de 2002 (2003). A origem do coronavírus foi mais tarde identificada em pacientes com SARS (Síndrome Respiratória Aguda e Grave). A detecção do vírus nestes indivíduos, a sua ausência em controlos saudáveis ou em outros indivíduos com pneumonia atípica, e da reprodução de uma doença semelhante, num modelo animal indicou que os coronavírus foram os agentes causadores da pneumonia atípica (SARS-cov) (Berger, Drosten et al. 2004). Curiosamente, a sequência

do genoma completo foi determinada na semana da identificação do vírus, mas o proteoma e a pesquisa de biomarcadores associados com a SRA estão em desenvolvimento. Num estudo recente utilizando espectrometria de massa, Kang et al. identificaram quatro biomarcadores que poderiam com precisão detectar em 36 de 37 amostras (sensibilidade, 97,3%) SRA positivas e 987 de 993 (especificidade, 99,4%) amostras não-SRA (Kang, Xu et al. 2005). A maioria das proteínas foram identificadas em fase aguda, e a sua presença representou a consequência de uma série de reacções inflamatórias em cascata iniciada pela infecção da SRA-Cov (Kang, Xu et al. 2005).

Os proteomas de outros três vírus de RNA incluindo o HCV, HBV e HIV-1, têm também sido estudados. A hepatite C progride muitas vezes para uma infecção crónica na maioria dos casos e é uma causa emergente de hepatites virais. Clinicamente a infecção é normalmente assintomática, mas pode apresentar uma variedade grande de sintomas. A cirrose, o carcinoma hepatocelular (HCC), a crioglobulinemia e a glomerulonefrite têm sido associadas à infecção por HCV (Dickson 1997). Ao analisar proteínas que interagiram com a proteína NS5A do HCV, Choi et al. constatou que 27 proteínas citoplasmáticas de choque térmico (HSP27) ligadas à NS5A foram concentradas no retículo endoplasmático (Choi, Tan et al. 2004), onde o medicamento para o tratamento do VHC teria acesso fácil (em contraposição aos medicamentos entregues no núcleo). A infecção crónica com HBV está associada com a maioria dos HCC. Foi demonstrado por electroforese 2D em gel, que várias glicoproteínas estão correlacionadas ao prognóstico do cancro. Uma dessas glicoproteínas, a proteína Golgi 73 (GP73), foi encontrada elevada e com níveis elevados de glicosilação em animais com HCC (Gonzalez-Moles, Gutierrez et al. 2002). Finalmente, num esforço para identificar biomarcadores-HBV ou HCV-associados ao HCC, foram identificados 60 proteínas que apresentaram mudanças significativas na expressão entre tecidos não tumorais e tumorais. Entre estas, 14 proteínas foram comumente alteradas nos três tipos do HCC, mas 46 proteínas mostraram uma tendência de especificidade para marcadores virais, sugerindo que os mecanismos de patogenicidade e hepatocarcinogénese podem ser diferentes de acordo com a etiologia viral de HBV ou HCV (Kim, Oe Lim et al. 2003).

Devido às elevadas taxas mundiais de co-infecções por HIV e HCV, novos biomarcadores, estratégias de tratamento e directrizes para a gestão das co-infecções continuam a ser os principais objectivos dos investigadores. Os biomarcadores podem incluir impressões digitais da proteína dos MDMs humanos após infecção viral por HIV-1, como as células hepáticas infectados por HCV. Recentemente 58 proteínas foram já identificadas como sendo hiper ou hipo-reguladas após infecções por HIV-1 (Carlson, Ciborowski et al. 2004).

Um outro factor comumente associado à etiologia do CCEO é a mutação do p53 (Hsieh, Wang et al. 2001; Opitz, Suliman et al. 2001; Gasco and Crook 2003). Desde a descoberta da p53, no final da década de 70, acredita-se que esta seja responsável pela modulação da resposta celular ao stress endógeno ou exógeno (Gonzalez-Moles, Gutierrez et al. 2002; Gasco and Crook 2003; Schliephake 2003).

A p53 pode bloquear o ciclo celular na fase G1 de células com danos subletais no seu genoma (Gonzalez-Moles, Gutierrez et al. 2002). Além disso, pode induzir apoptose, evitando o desenvolvimento de clones de células com graves danos no DNA (Gonzalez-Moles, Gutierrez et al. 2002). A ausência de p53 nativa, seja por inativação ou destruição, e algumas mutações da proteína nativa são capazes de impossibilitar a função de guardião do genoma exercida pela p53, permitindo assim a sobrevivência de células com danos no seu DNA (Opitz, Suliman et al. 2001; Gonzalez-Moles, Gutierrez et al. 2002; Gasco and Crook 2003).

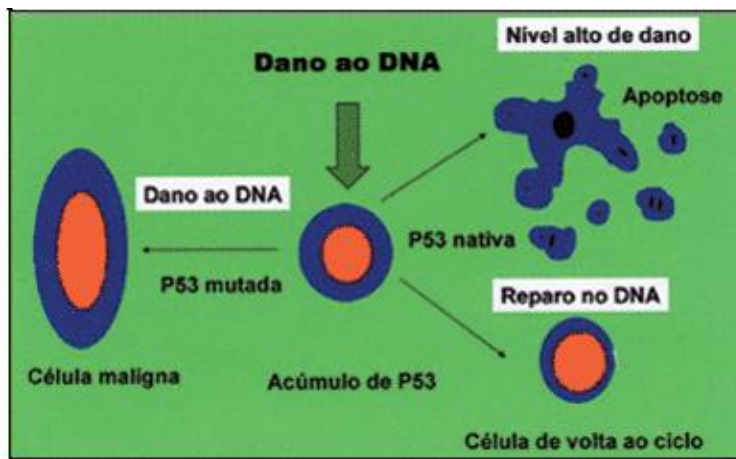


Figura 7: Função da p53 no controle da proliferação. A p53 mutada ou inativa leva à transformação maligna. (adaptado de www.scielo.br)

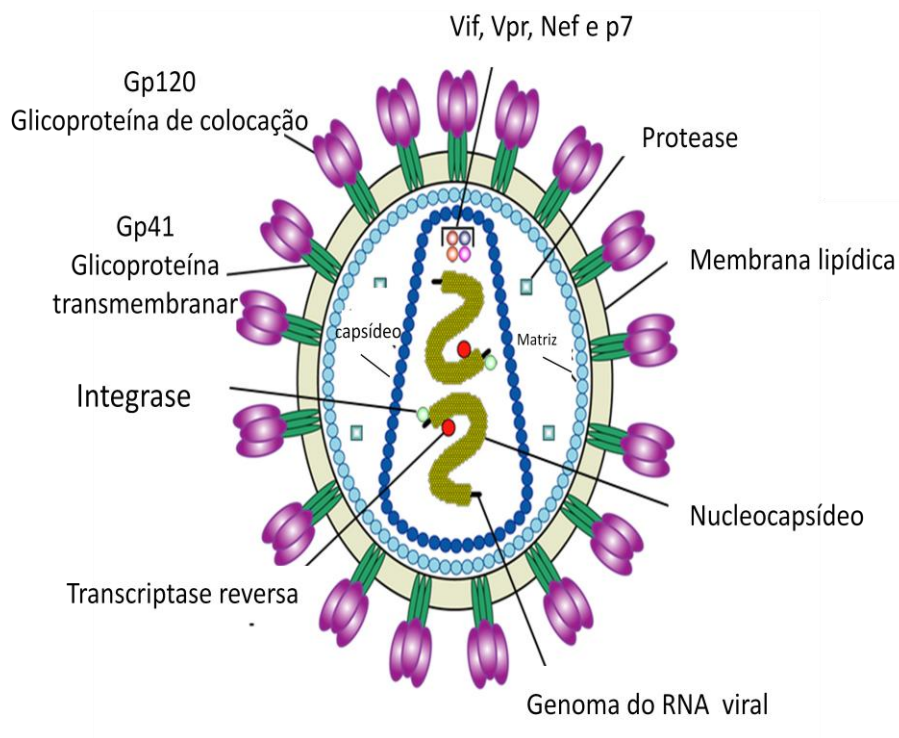


Figura 8: Virão HIV (<http://upload.wikimedia.org>)

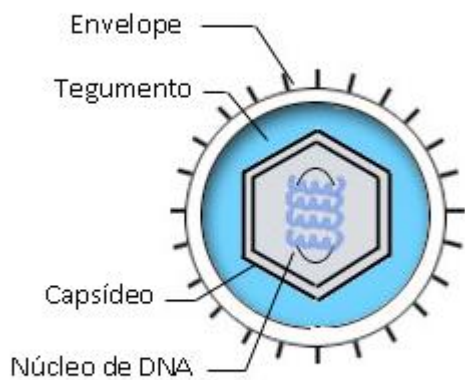


Figura 9: Virão de Herpesvírus (<http://www.oralgen.lanl.gov>)

3. Objectivos

Este trabalho apresenta como objectivo principal, a identificação de proteínas virais na saliva. Esta abordagem envolve também a identificação de espécies virais de indivíduos com cancro da cabeça e pescoço.

Aproveitando a recente evolução de metodologias e equipamentos na área da peptidómica, este trabalho visa contribuir para um melhor conhecimento da análise viral da saliva e possibilitar o desenvolvimento de estudos subsequentes.

II – Material e Métodos

II. Material e métodos

1. Descrição e caracterização da amostra

Para o presente estudo utilizaram-se amostras de saliva de 10 indivíduos com tumores de cabeça e pescoço fornecidas pelo Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil. Este estudo foi submetido à aprovação da Comissão de Ética local. Os indivíduos que participaram neste estudo eram todos do sexo masculino, com idades compreendidas entre os 45 e 77 anos. Todos os indivíduos participantes neste estudo foram esclarecidos sobre a natureza do trabalho científico a realizar, tendo-se garantido a privacidade e a confidencialidade dos dados. Os participantes assinaram ainda um consentimento informado autorizando a recolha da amostra de saliva e a sua utilização para fins científicos.

Foram utilizados seis indivíduos saudáveis, como grupo controlo, do sexo masculino com idades compreendidas entre os 25 e os 30 anos.

1.1. Preparação e colecta de saliva

A saliva utilizada neste estudo foi colectada entre as oito e as dez horas da manhã após um jejum de doze horas. As amostras de saliva foram processadas de acordo com o procedimento descrito por Vitorino et. al (Vitorino, Lobo et al. 2004) para obtenção da fracção peptídica. Resumidamente, à amostra adicionou-se, na proporção de 1:1 uma solução de 0,2% TFA. Após uma incubação de cinco minutos no gelo, a amostra foi centrifugada a 12000g durante 10 minutos a 4°C (Sigma *Laboraty Centrifuges* 2K15, B. Braun *Biotech International*). Desta centrifugação resultou um precipitado correspondendo à maioria das proteínas de elevado peso molecular e um sobrenadante correspondendo a uma fracção enriquecida de péptidos que foi utilizado. Como o objectivo deste trabalho foi a análise dos péptidos presentes na saliva, procedeu-se a um novo fraccionamento do sobrenadante utilizando filtros com *cut off* de 50kDa seguindo as instruções do fabricante. Desta forma o eluato obtido contém apenas péptidos de baixo peso molecular. Imediatamente a seguir ao isolamento dos péptidos retirou-se uma parte da amostra para a determinação da proteína total e o restante foi imediatamente colocado a -80°C de forma a evitar a degradação da amostra para posterior análise por nano-HPLC.

A determinação da concentração de proteína total presente nas fracções de saliva foi efectuada de acordo com o método colorimétrico “DC protein assay” da BioRad. Os valores de densidade óptica foram determinados a 750nm num espectrofotómetro (Genesys 6, Thermo, USA). Simultaneamente, foi efectuada uma curva de calibração utilizando-se para o efeito padrões de albumina sérica bovina (BSA) com diferentes concentrações.

1.2. Nano-HPLC

A separação por nano-HPLC foi executada no módulo de separação *Ultimate 3000 (LC Packings)* utilizando uma coluna capilar (C18 *Zorbax SB 300*; 0.75mm diâmetro interno; 15 cm comprimento). As amostras utilizadas foram injectadas com a concentração de 1,2µg/µL. A separação dos péptidos foi executada utilizando um gradiente linear de 95% de solvente A (constituído por 95% de água, 5% de ACN e 0,05% de TFA), 5% do solvente B constituído por (20% de água, 80% de ACN e 0,04% de TFA) até 45% de solvente A, 55% solvente B com um caudal de 300 nL/min.

Os péptidos depois de eluírem da coluna capilar nanolítica foram aplicados directamente numa placa de MALDI em fracções de 20 segundos, utilizando um colectador automático de fracções *Probot (LcPackings)* com adição de 270nL de matriz constituída por 12mg de ácido alfa-ciano-4-hidroxicinâmico, 70% de acetonitrilo, 30% água, 0,3% TFA e adição de padrão interno (péptido *Glu-fib -*) para posterior identificação e caracterização dos péptidos.

1.3. Espectrometria de massa

Os espectros foram efectuados num espectrómetro de massa MALDI-TOF/TOF (4800 Proteomics Analyzer; Applied Biosystems) com o reflectrão em modo positivo e obtidos espectros no intervalo de massas desde os 700-4500 Da, com 1500 tiros de laser.

1.4. Pesquisa nas bases de dados

Os espectros foram processados e analisados pela “*Global Protein Server Workstation*”, da *Applied Biosystems*, utilizando o software Mascot (*Matrix Science Ltd, UK*) para a pesquisa dos “*peptide mass fingerprints*” e dos dados de MS/MS nas bases de dados não redundantes da *SwissProt* e da NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Para uma maior confiança nos resultados das identificações foram utilizados nas pesquisas tanto os espectros de MS como os de MS/MS. Os desvios introduzidos na pesquisa para identificação das proteínas para dados de MS e de MS/MS foram de 40ppm e de 0.3 Da, respectivamente. A identificação da proteína foi aceite quando o grau de confiança era superior a 98,5%.

III – Resultados

I. Resultados

1. Caracterização histológica dos indivíduos em estudo

No sentido de caracterizar a população em estudo, procedeu-se à categorização dos doentes de acordo com a histologia do tumor e presença ou ausência de metástases. Neste sentido, verificou-se que a maioria dos indivíduos tinha carcinoma espinocelular na língua, sendo dois deles infiltrativos. Como podemos observar na tabela 1, metade desses indivíduos continham metástases, enquanto a outra metade não. O indivíduo 9 apresenta granuloma espinocelular na língua. Um dos indivíduos apresentava carcinoma espinocelular no pavimento inferior da boca, mas não obtivemos informação em relação à presença de metástases. Por último, obtivemos um indivíduo com carcinoma espinocelular bem diferenciado no maxilar, não apresentando metástases.

Tabela 1: Dados histológicos dos doentes

Nº Indivíduo	Histologia do tumor	Metástases?
1	Carcinoma espinocelular bem diferenciado no maxilar	Não
2	Carcinoma espinocelular “ <i>in situ</i> ” na língua	Não
3	Carcinoma espinocelular no pavimento inferior da boca	Dados em falta
4	Carcinoma espinocelular (recidiva) na língua	Não
5	Carcinoma espinocelular na língua	Sim
6	Dados em falta	
7	Carcinoma espinocelular infiltrativo na língua	Sim
8	Carcinoma espinocelular infiltrativo na língua	Sim
9	Granuloma espinocelular na língua	Não
10	Carcinoma espinocelular “ <i>in situ</i> ” (recidiva) na língua	Não

2. Blast das proteínas identificadas

De acordo com Material e Métodos foi efectuada a pesquisa de proteínas virais nas amostras de saliva. No total foram identificadas 13 proteínas com elevado grau de confiança atribuíveis a espécies virais (Tabela 2). De modo a confirmar a atribuição das proteínas identificadas a uma espécie viral pesquisou-se por Blast homologias para todos os péptidos identificados por Espectrometria de Massa. Na Tabela 2 (são fornecidas as listagens de péptidos e respectivo resultado de Blast como dados suplementares em Anexo) indicam-se o nome das proteínas identificadas, as homologias possíveis e a espécie de vírus correspondente.

Tabela 2: Nome dos vírus identificados através do blast nos indivíduos com tumor e respectivas homologias

Nome da proteína	Nome do vírus	Homologia
Tirosina-quinase	Vírus sarcoma felino	+ De 250
Proteína L291	<i>Acanthamoeba polyphaga mimivirus</i>	Cromossoma 18 SCAF14786
Proteína E4	Papilomavírus humano tipo 5	Proteína E4
Proteína E4	Papilomavírus humano tipo 5b	Proteína E4
Proteína E4	Papilomavírus humano tipo 47	Fusão da proteína E1/E4
Epstein-Barr antígeno nuclear 2	Vírus Epstein-Barr	Epstein-Barr nuclear antígeno 2; Truncated tipo 2; EBNA2; EBNA-2; Nuclear proteína ZAP; Proteína 02g0215000; Proteína putativa não caracterizada; Previsivelmente proteína; Cromossoma 13; SCAF15122; Proteína quinase; Proteína quinase-11 que interage com serina / treonina; Gene dispersos família proteína 1 (DGF-1), putativo
Factor neurovirulence ICP34.5	Herpesvírus humano simplex 1	RL1 Proteína neurovirulence ICP34.5 Gamma1 34,5

Proteína GTP ligada a lepA	<i>Citofaga hutchinsonii</i>	-
Factor de tradução SE-2	<i>Solibacter usitatus</i>	-
Proteína TP_0577	<i>Treponema pallidum</i>	Proteína TP_0577 não caracterizada
Antígeno nuclear	Herpesvírus Suíno 1	Vírus da pseudo ORF1, ORF2, e ORF3; Proteína putativa ORF3; Proteína putativa não caracterizada; Proteína putativa da membrana; Helicase; Formin, como proteína 10; Cromossoma 7 SCAF15001; BimA; Auto transportador da membrana externa; Motilidade intracelular da proteína A; Hidroxiprolina rica em glicoproteína DZ-HRGP; Proteína feroforina -dz1; Feroforina; Hidroxiprolina rica em glicoproteína GAS31; Proteína feroforina V1; Proteína da parede celular da feroforina C3; Feroforina S
Proteína 94.0 kDa	<i>Autographa californica nuclear po</i>	-
Proteína viral Myc	<i>Vírus Avian mlelocltomatosis</i>	Proteína viral myc; Proteína de fusão Gag-myc; Proteína myc; Poli proteína Gag; Proteínas proto-oncogene Myc

A Tirosina-quinase foi identificada através de 17 péptidos com um grau de confiança de 100%, contudo apresenta muitas homologias também com 100% de grau de confiança, nomeadamente com a família de proteínas actina. Este grau de homologia não permite a identificação com segurança da presença do vírus do sarcoma felino. A Proteína L291 foi identificada através de um péptido com um grau de confiança de 100%. Apresenta homologia com a proteína Cromossoma 18 SCAF14786, apresentando esta um grau de confiança de 90%. A proteína E4 foi identificada através de 21 péptidos com um grau de confiança de 100%, apresentando homologias com a proteína de fusão E1-E4. A proteína Epstein-Barr antígeno nuclear 2 foi identificada a partir de 15 péptidos com um grau de confiança de 100%, no entanto as homologias correspondentes apresentam um grau de confiança entre 90 e 95%. A proteína correspondente ao factor neurovirulence ICP34.5 foi identificada a partir de 20 péptidos com um grau de confiança de 100%, contudo as homologias apresentam um grau de confiança entre 85 e 96%. A proteína antígeno nuclear foi identificada através de 144 péptidos, apresentando todos um grau de confiança de 100%. No entanto, as 16 homologias com esta proteína apresentam um grau de confiança entre 91 e 96%. A proteína viral Myc foi identificada através de 2 péptidos, apresentando um grau de confiança de 100%, assim como as homologias. Contudo também foram identificadas mais proteínas, como por exemplo, a Proteína 94.0

MPLSASLP SKNYDYDYSVQPYFYFEIEEEENFYLAQQRGSELQPPAPSEDIWKKFELLMPPLSPSRRSSLAAASCFPSTADQLEM

VTLLGGDMVNSFCIDPDDESEFVKSIHQDCMWSGFSAAAKLEKVVSEKLATYQASRQEGGPAASRP GPPPSGPPPPAGPAASA
 SRGPPPSGPPPPAGPAA
 PGPSPSGPPPPAGPAASA

GLYLHDLGAAAADCIDPSVVFYPLSERAPRAAPPANPAALLGVDTPPTTSSDSEEEQEEDDEIDVVTLEANESESSTESSTEASE
 GLYLHDLGA PLSERAPRAAP

EHCKPHHSPLVLKRCHVNIHQHNYAAPSTKVEYPAKRLKLDSEGRVLKQISNNRKCSSPRTLDSEENDKRTHNVLERQRRNELKL

RFFALRDQIPEVANNEKAPKVILKKATEYVLSLQSDHEKLI AEKEQLRRRREQLKHNL EQLRNSRA

Indivíduo 6- cor azul

Figura 11: Sequência primária do Viral myc transforming protein OS=Avian myelocytomatosis virus MC29 GN=MYC PE=3 SV=2 (indivíduo 6- cor azul).

MARRRRRHRCPRRPRPPGPTGAVPTAQSQTSTPNSEPVVRSAPAAAPPPPPAGGPPPPSCSLLLQWLQVPESASDDDDDDWPD
 RGPRRPRPPGPTGAVPTAQSQ PAGGPPPPSCSLLLQWLQVPESASDDDD
 GPRRPRPPGPTGAVPTAQSQTST PAAAPPPPPAGGPPPPSCSLLLQWLQVPESASDDDD
 PRPPGPTGAVPTAQSQTST PPAGGPPPPSCSLLLQWLQVPESASDD
 GPRRPRPPGPTGAVPTAQSQ AAAPPPPPAGGPPPPSCSLLLRQ
 GPRRPRPPGPTGAVPTAQSQ PAGGPPPPSCSLLLQWLQVPESASDD
 PAGGPPPPSCSLLLQWLQVPESASDD
 PPPPPAGGPPPPSCSLLLQWLQVPES
 PPAGGPPPPSCSLLLQWLQV
 PAAAPPPPPAGGPPPPSCSLLLQWLQVPESA
 PAGGPPPPSCSLLLQWLQVPESASDD
 PAAAPPPPPAGGPPPPSCSL
 PAAAPPPPPAGGPPPPSCSL
 PAGGPPPPSCSLLLQWLQVPESASDDSPPEPAPEARPTAAAPRPRSPPPGAGPGGGADPSHPPSRPRLPRLALRLRVTAELAR
 PGAGPGGGANPSHPPSRPRLPRLALRLR
 PPGAGPGGGADPSHPPSRPRLPRL
 PPGAGPGGGADPSHPPSRPRLPRLALRLRVTAELAR
 PGAGPGGGADPSHPPSRP
 PGAGPGGGADPSHPPSRP
 PPGAGPGGGADPSHPPSR
 LRLRRAGGEGAPEPATPATPATPATPATPARVRFSPHVRVRLVWASARLARRGSWARERADRARFRRRVAEAEVIGPCL

GPKARARALARGAGPANSV

Indivíduo 3- cor rosa

Figura 12: Sequência primária do Neurovirulence factor ICP34.5 OS=Human herpesvirus 1 (strain CVG-2) GN=RL1 PE=3 SV=1 (indivíduo 3- cor de rosa).

KLIRILCLLLSPAPRLQGRQEDKQTQTTPPPPPPPQPLTPRPDSSPHQNSHNKPKPEEEGTGGPPASQGDRKRSKGDQGPDTGPGGLGPGRAPSPKPTPLGPPPGGPPRRSAR
 KQTQTTPPPPPPPQPLTPRPDSSPH GPGPRRSAR
 PGGPRRSAR
 PPPGGPRRSAR
 PGRAPSPKPTPLGPPPGGPR
 LGPGRAPSPKPTP

LGPLQADRDPEGEPQVPAEGEVEGHHPGGDQGHPPPTPPAPHNGHSGHGPKVQVQEGPEGREGHEEGAVGGDCGDEEGHPPPPPTNGHEGGLSSVASLLVKWEGHFD
 LGPLQAD
 LGPLQADRDPEGEPQ
 LGPLQADRDPEGEPQVPAEGEVE

QLVQSIQDDLEDYWKLATPQ

Indivíduo 2 – cor verde
 indivíduo 5- cor vermelha
 Indivíduo 6- cor azul

Figura 13: Sequência primária do Probable proteína E4 OS=Human papillomavirus type 5b GN=E4 PE=4 SV=1 (indivíduo 2- cor verde, indivíduo 5- cor vermelha e indivíduo 6- cor azul).

MTKMKQMLICILCGHLCITWIQMMCGIRQQVGSIKLAFTTMEHLNTIMCYLLMMQRDIVLLENGKLLKIRKLCLLLSLAPHHQHGHQEDKQTQTPTPPRPPPPP

QPPLTPRPDANPSINSHNPKPNEEGTDGDHQAEGQDRKRTKGDPPDPGRGPVLKPTLPPPPPPPTGPGLRRSTRVLVPGQGPPPDLPAPPVEGEVEGHP

PGRGPVLKPTLPPPPPPPTG QGPPPDLPAPPVEGEVEGHP

PVLKPTLPPPP PGQGPPPDLPAPPVEGEVEGHP

PPPTGPGLRSTRVLVPGQGPPPDLP

QGKDRDHPPPTPQNGHGKETQAEGGGDKGEQGAVGGESSDGEGDHSQLPPLTPPNESDGLLNTVACLLARWESNFDQLVQNIQGDLEGYWRKLGTPQ

QGKDRDHPPPTPQ

QGKDRDHPP

Indivíduo 2 – cor verde
indivíduo 5- cor vermelha
Indivíduo 6- azul

PPAGPAASAGLYLHDLGAAAADCIDPSVFPYPLSERAPRAAPP

Figura 14: Sequência primária do Probable protein E4 OS=Human papillomavirus type 47 GN=E4 PE=4 SV=1 (indivíduo 2- cor verde, indivíduo 5- cor vermelha e indivíduo 6- cor azul).

MLIRKLCLLSPAPRLQGRQEDKQKTQTTPPRPPPPQPPPLTPRPDSSPHQNSHNKPKPEEEGTDGGPPASQGDRKRSKGDQGPDTGPGGLGPRGSPKPTPLGPPPGPGPRRSR
 PQPPLTPRPD PEEGTDGGPP PPGPGPRRSR
 PPRPPPPQPPPLT TTPPRPPPPQPPPLTPRPDSSPHQ PSPKPTPLGPPPGPRRSR
 LGPLQADRDPEEGPQPPAEGVEGHPGGDQGHPPPPPAAPHNGHSGHEPKVQQPEGPEGREGHEEGAVGGEGGDEEGHPPPPPPPTNGHEGGLSSVASLLVKWEGHFDQ
 LGPLQADRD GPQPPAEGVEGHPGGDQGHPPPPPAAPHNGHS EGHPPPPP GLLSSVASLLVKW
 LGPLQA GEGGDEEGHPPPPPPPTNGHEGGLSSVASLL
 PGDQGHPPPPP
 PGDQGHPPPPP
 PGDQGHPPPPP
 GDQGHPPPPP
 PGDQGHPPPPP
 PGDQGHPPPPP
 PGDQGHPPPPP
 PGDQGHPPPPP
 GPQPPAEGVEGHPGGDQGHPPPPPAAPHNG
 LVQSIODDLEDYWK LATPO

Figura 15: Sequência primária do Probable protein E4 OS=Human papillomavirus type 5 GN=E4 PE=4 SV=2 (indivíduo 2- cor verde, indivíduo 5- cor vermelha e indivíduo 6- cor azul).

MENIRNFCIIAHIDHGKSTLADRLLEFTSTVSNRQMQAQVLDDMDLERERGITIKSHAIQ MNYIYEGQKYVLNLIDTPGHVDFSYEVS
 RSIAACEGALLIVDAAQGIEAQTISNLYLALE NDLEIIPVLNKIDLPGAMPEEVKDQVVELLGCDRDSIIPASGKEGIGIFEILAAIIQRIP
 PPKGDPKAPLQALIFDSQFNSFRGIEVMFRIFNGTIKKGDKVKFINIGKEYYADEIGVLK LQQEPQLEMSAGNVGYIISGIKEAKDVKV
 PPKGDPKAPLQALIFDSQF
 GDTITHVSRPGEPIQGFADVKPMVFAGIYPV ETSEFEDLRAAMEKLQLNDASLVWEPETSIALGFGFRCGFLGMLHMEIVQERLEREFD
 MT VITTVPSVQFKAYLTGKNEMVVVNAPSMDPEPTTLDYIEEPYIKAQIITKADFVGPVISL CMDKRGITNQTYLTSDRVELTFELPLA
 EIVDFDFDKLKTISKGYASLDYELIGFRESNV IKLDIMLNGEKVDALSATIVHRDKAYDWGKRLCEKCLKDILPMQMFEIAVQAAGQKIIA
 RE TVKAMRKNVLAKCYGGDISRKRLLEKOKKGKKRMROVGNVEIPOAAFMAILKLD0

Figura 16: Sequência primária GTP binding protein lepA OS=Cytophaga hutchinsonii (strain ATCC 33406 NCIMB 9469) GN=lepA PE=3 SV (indivíduo 4-cor amarelo torrado) .

Universidade de Aveiro Departamento de Química
2009 - 39 -

[illegible]

PGPAGPGPGPEDEVTVLGALMESPTGGPGGRGPGVLVLLVFFV
 PGPAGPGPGPEDEVTVLGALMESPTGGPGGRGPGV
 PGPAGPGPGPEDEVTVLGALMESPTGGPGGRGPGVLLV
 AGPGPGPEDEVTVLGALMESPTGGPGG
 PGPAGPGPGPEDEVTVLGALMESPTGGPGGRGPGV
 PGPAGPGPGPEDEVTVLGALMESPTGGPGGRGPGVLLV
 AGPGPGPEDEVTVLGALMESPTGGPGG
 PGPAGPGPGPEDEVTVLGALMES
 PGPAGPGPGPEDEVTVLGA
 PGPAGPGPGPEDEVTVLGALMESPTGGPGG
 PGPPEDEVTVLGALMESPTGGPG
 PGPAGPGPGPEDEVTVLGALMESPTGGP
 PGPPEDEVTVLGALMES
 PGPPEDEVTVLGALMESPTGGPG
 PGAGPGPGPEDEVTVLGALMES
 PGP
 PGPAGPGPGPEDEVTVLGALMESPTGGPGGRGPGV

Indivíduo 5- cor vermelha
 Indivíduo 6-cor azul
 Indivíduo 7-cor roxo
 Indivíduo 8-cor laranja
 Indivíduo 9- cor castanho

Figura 17: Sequência primária do Probable nuclear antigen OS=Suid herpesvirus 1 (strain Kaplan) PE=4 SV=1 (indivíduo 5- cor vermelha indivíduo 6- cor azul, indivíduo 6- cor azul, indivíduo 7- cor roxo, indivíduo 8- cor laranja e indivíduo 9- cor castanho).

MANNYKDLFDIDSFDETNIYVKPLFFFEASRHMGIYYEKEIIMKKPVNPSNKSNSKSKLNKTNKSNSNSKDELKKSNSNSKSSALK
 KSNKSSNSKSSNSKSSNSKSSNSKSSNSKSSNSKFPDKSDKSDSSNSDSDNSDDSDSSNSDSEFETIKTKKKQKIIKTPKMIVPFGVKEF
 DNNGRKNYQMSLSFSTMTNLYNEEEIKKFHGFIKLTDKINEETIMDYKDTWKLPGKLYKRSQRLSKDYPHININMPHDEKMGFMFN
 VYDEKGGKSKPDIIDKRSIVSAIIELTDLKFTDTEFRANWTLQVRKFKPYSPIQEFFMTECFICDEDNPEDTVYSKLIKQYQTLKTPITF
 PQYPQMNPSSSSGYAIPYITPYQSNYPYPTTYPTTYPTPLFSEPTIPKPPQQTTEPPSGFKPPSLSELLSAKLLKPTKTTVKGV
 NYPIYPPTYPTTY
 TEGKVVEDDHTSVADIPPPPPPPSISSD NSSPNKSVKSSTKSSTKSSTKSSTKSSTKSSTKSPSKTPVKSPIKSSSKLSDKKSPTKKI
 ESSGESDSESDSESDSKTTKKSTNKIKKITNNKLENSNTKNKKFSKKKTISLDK

Indivíduo 4 – cor amarelo torrado

Figura 18: Sequência primária do Uncharacterized protein L291 OS=Acanthamoeba polyphaga mimivirus GN=MIMI_L291 PE=4 SV=1 (indivíduo 4- cor amarelo torrado)

Podemos verificar que algumas proteínas foram identificadas com os mesmos péptidos em indivíduos diferentes, como é o caso da Probable proteína E4 onde foram encontrados péptidos pertencentes a três indivíduos (2, 5 e 6) distintos, que correspondem aos vírus HPVs 5, 47 e 5b. Podemos verificar nas figuras 15, 14 e 13, respectivamente, que o número de péptidos para identificar este vírus é pequeno, mas no entanto foram todos identificados com um grau de confiança de 100% quando realizado o Blast. O vírus Epstein-Barr (figura 10) foi encontrado em dois indivíduos (2 e 6) e pelo número de péptidos encontrados podemos dizer que este vírus está presente na nossa amostra, verificando-se a existência de péptidos iguais em indivíduos diferentes. O

Herpesvírus humano do tipo 1 (figura 12) está presente apenas no indivíduo 3. O vírus Avian mielocitomatosis MC29 (figura 11) também está presente num único indivíduo (6), assim como o Acanthamoeba polyphaga mimivirus (figura 18). O herpesvírus Suid do tipo 1 (figura 17) está presente em 5 indivíduos (5, 6, 7, 8 e 9), foi identificado com um elevado número de péptidos, muitos iguais, nos diferentes indivíduos.

4. Análise da distribuição dos vírus em função dos indivíduos em estudo

Como acima foi mostrado a pesquisa de proteínas virais permitiu a identificação de um total de 13 proteínas virais correspondentes ao mesmo número de espécies virais. Doze destas proteínas foram identificadas nos indivíduos com tumor e 5 nos indivíduos controlo (Tabela 3). Ao compararmos os vírus manifestados no controlo e nos indivíduos com tumor, só identificamos um vírus em comum que é o herpesvírus suíno do tipo 1.

Tabela 3: Proteínas de vírus existentes nos indivíduos saudáveis e nos indivíduos com tumor

Nome da proteína/ Nome do vírus	Indivíduos controlo	Indivíduos com tumor
Tyrosine-protein kinase transforming protein Fgr OS=Feline sarcoma virus (strain Gardner-Rasheed) G	-	1,2,3,9
Transcriptional regulator IE63 homolog OS=Human cytomegalovirus (strain AD169) GN=UL69 PE=3 SV=1	-	1
Uncharacterized protein L291 OS=Acanthamoeba polyphaga mimivirus GN=MIMI_L291 PE=4 SV=1	-	1
Probable protein E4 OS=Human papillomavirus type 5 GN=E4 PE=4 SV=2	-	2,5,6
Epstein-Barr nuclear antigen 2 OS=Epstein-Barr virus (strain B95-8) GN=EBNA2 PE=1 SV=1	-	2,5,6
Probable protein E4 OS=Human papillomavirus type 47 GN=E4 PE=4 SV=1	-	2,5,6
Probable protein E4 OS=Human papillomavirus type 5b GN=E4 PE=4 SV=1	-	2,5,6
Uncharacterized 94.0 kDa protein in POL-LEF3 intergenic region OS=Autographa californica nuclear po	-	2

Neurovirulence factor ICP34.5 OS=Human herpesvirus 1 (strain CVG-2) GN=RL1 PE=3 SV=1	-	3
Large-conductance mechanosensitive channel OS=Flavobacterium johnsoniae (strain ATCC 17061 / DSM 20	-	4
Probable nuclear antigen OS=Suid herpesvirus 1 (strain Kaplan) PE=4 SV=1	✓	5,6,7,8,9
Viral myc transforming protein OS=Avian myelocytomatosis virus MC29 GN=MYC PE=3 SV=2	-	6
Capsid protein P40 OS=Human herpesvirus 1 (strain 17) GN=UL26 PE=1 SV=1	✓	-
Trans-acting transcriptional protein ICP0 OS=Human herpesvirus 2 (strain HG52) GN=RL2 PE=4 SV=1	✓	-
Large delta antigen OS=Hepatitis delta virus (isolate VnzD8349) PE=2 SV=2	✓	-
Replication-associated protein A OS=Sugarcane streak virus (isolate South Africa) GN=C1 PE=3 SV=1	✓	-

Através do gráfico apresentado na Figura 19 podemos verificar que existem algumas semelhanças entre os indivíduos. No caso dos indivíduos 2, 5 e 6 eles contêm as mesmas proteínas, correspondentes aos vírus HPV5, HPV5b, HPV47 e EBV. O indivíduo 3 é muito diferente dos outros pois apresenta apenas um tipo de proteína viral que não é expresso nos outros indivíduos. No indivíduo 1 apenas foi identificado o *Acanthamoeba polyphaga* mimivírus. Podemos também observar outro grupo de indivíduos, 5, 6, 7, 8 e 9, no qual está presente o mesmo vírus, o herpesvírus 1 suíno.

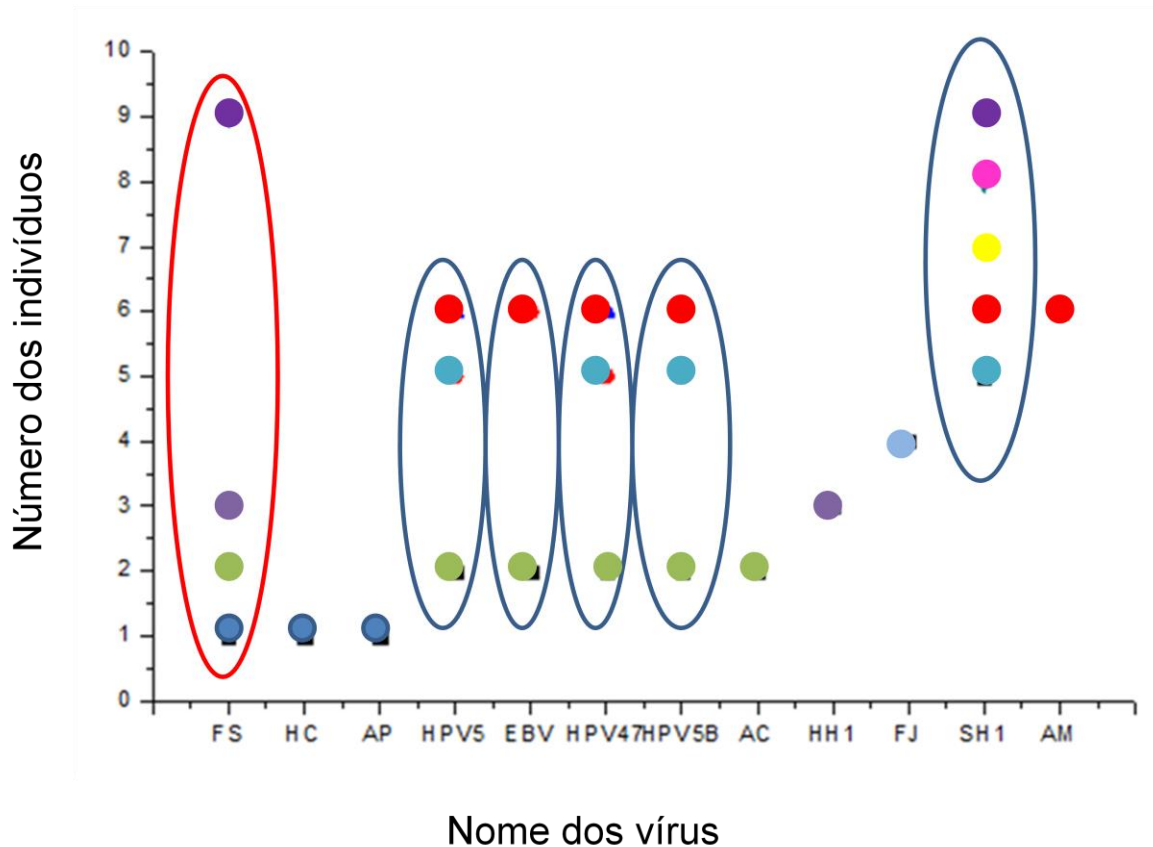


Figura 19: Representação das proteínas encontradas em função dos indivíduos e dos péptidos sendo FS- Felina sarcoma vírus; HC- citomegalovírus Humano; AP- Acanthamoeba polyphaga mimivírus; HPV5- Papilomavírus Humano tipo 5; EBV- Epstein-Barr vírus; HPV47- Papilomavírus Humano tipo47; HPV5B- Papilomavírus Humano tipo 5b; AC- Autographa californica nuclear po; HH1- Herpesvírus Humano 1; FJ- Flavobacterium johnsoniae; SH1- Herpesvírus Suíno 1 e AM- vírus Avian mielocitomatosis .

IV- Discussão

II. Discussão

O cancro oral permanece como um sério e grave problema de saúde pública (Soares, Malavazi et al. 2002). Este cancro é a sexta neoplasia mais comum no mundo, ocupando o terceiro lugar nos países em desenvolvimento e o oitavo nos países desenvolvidos (Syrjanen 2005), mas este termo define um grupo heterogéneo de neoplasias malignas, envolvendo subsítios semelhantes com diferentes factores de risco e fisiopatologia (Termine, Panzarella et al. 2008).

O cancro oral é uma doença multifactorial com diferentes elementos envolvidos na sua ocorrência, destacando-se o fumo, o álcool e os vírus, como os principais agentes etiológicos envolvidos na carcinogénese oral. No entanto, estes hábitos nem sempre justificam o desenvolvimento desta neoplasia (Scully 2002; Syrjanen 2005).

De entre estas neoplasias, o carcinoma espinocelular oral é o tipo mais frequente de cancro da cavidade oral (Scully 2005). Apesar dos grandes avanços e descobertas, este tipo de cancro tem um mau prognóstico, com uma taxa de sobrevivência de 56% em cinco anos (Kademani, Bell et al. 2005).

Nos últimos anos o HPV tem chamado a atenção dos investigadores como possível agente etiológico do cancro da cabeça e pescoço. Este vírus é fortemente associado ao cancro do colo uterino, sendo detectado em quase 100% dos casos com esta neoplasia, porém a sua participação na carcinogénese oral ainda não é inclusiva (Villa 1997; McMurray, Nguyen et al. 2001; Sugiyama, Bhawal et al. 2003; Ibieta, Lizano et al. 2005).

O principal objectivo deste estudo foi o de verificar se a peptidómica viral poderia auxiliar no diagnóstico e detecção de doenças como por exemplo, a detecção de péptidos potenciais biomarcadores de cancro. De acordo com a literatura não há nenhum estudo realizado para a determinação de vírus através da peptidómica, sendo este trabalho o primeiro a ser realizado.

Dos indivíduos utilizados para a realização deste estudo verificamos que a localização anatómica era diferente em alguns indivíduos, temos que 6 destes apresentavam carcinoma espinocelular na língua, sendo dois deles infiltrativos e um granuloma espinocelular na língua. Destes sete indivíduos, quatro não apresentavam metástases, enquanto que os outros três continham metástases. Um dos indivíduos apresentava carcinoma espinocelular no pavimento inferior da boca, mas não obtivemos informação em relação à presença de metástases e outro indivíduo com carcinoma espinocelular bem diferenciado no maxilar, não apresentando metástases.

Ao compararmos os nossos resultados podemos dizer que temos diferentes indivíduos com o mesmo vírus, contudo a localização anatómica do tumor não é a mesma, como se pode observar na tabela 3, existindo maior semelhança entre as espécies encontradas em vários doentes com cancro localizado na língua enquanto que os indivíduos 1 e 3 com localizações tumorais diferentes têm também tipos de vírus diferentes. Estes resultados devem ser observados com reserva dado que foi usado um número limitado de doentes e a presença de vírus em número e espécie é variável.

Os HPVs de alto risco para este carcinoma são o HPV16, HPV18 e o Epstein-Barr, no entanto só foram encontrados nas amostras de indivíduos com tumores da cabeça e pescoço o vírus Epstein-Barr. Contudo, verificamos a existência de outros tipos de HPVs como o HPV5, HPV5b e o HPV47 que são vírus específicos do cancro da pele

(Muscardin, Poggiali et al. 2001) e no entanto estão presentes na amostra de tumores da cabeça e pescoço, o que leva a sugerir que a existência de múltiplos tipos de vírus num indivíduo com tumor pode resultar de infecções oportunistas indicativas que o sistema de defesa do organismo está debilitado.

Também foram encontradas várias variantes do vírus herpes simplex, sendo: citomegalovírus que é do tipo 5, Epstein-Barr nuclear do tipo 4 e dois herpesvírus Humano do tipo 1.

Os estudos do envolvimento deste vírus na carcinogénese oral têm gerado resultados conflitantes (Bouda, Gorgoulis et al. 2000). É extremamente difícil comparar os numerosos resultados sobre o HPV na cavidade oral devido a variações de diversos parâmetros, sendo: o tipo de amostra, a escolha do método de separação, diferenças étnicas entre os indivíduos, diferenças geográficas e o uso de métodos com diferentes níveis de sensibilidade. Destaca-se, que alguns autores sugerem que o HPV participa no desenvolvimento da carcinogénese oral, como um iniciador da proliferação epitelial, desempenhando um papel importante nos estágios precoces da carcinogénese oral, não sendo, contudo, requerida a sua presença contínua para o desenvolvimento do tumor (Sugerman and Shillitoe 1997; D'Costa, Saranath et al. 1998; Bouda, Gorgoulis et al. 2000; Sugiyama, Bhawal et al. 2003).

V- Conclusão

III. Conclusão

Tanto quanto é possível avaliar pela literatura da especialidade este é o primeiro trabalho que identifica vírus através da peptidómica da saliva em indivíduos com cancro da cabeça e pescoço.

Posso concluir que indivíduos com carcinomas anatómicos em locais diferentes da cabeça e pescoço podem conter diferentes tipos de vírus. Observamos também a existência de vírus pertencentes ao cancro da pele, como o HPV5, HPV5b e HPV47. Pode-se assim sugerir que a presença de várias espécies de vírus pode ocorrer por infecção oportunista.

Os resultados apresentados demonstram a importância da utilização da pesquisa de vírus, utilizando metodologias do domínio da proteómica, como o caso do nano-HPLC MS e MALDI TOF/TOF, podendo identificar um maior número de péptidos e um melhor conhecimento do peptidoma viral da saliva.

De acordo com o trabalho realizado pode-se concluir que a técnica utilizada foi eficaz para a descoberta de vírus existentes na saliva de indivíduos com tumores ao nível da cabeça e pescoço.

VI – Referências bibliográficas

IV. Referências bibliográficas

- (2003). "Prevalence of IgG antibody to SARS-associated coronavirus in animal traders--Guangdong Province, China, 2003." MMWR Morb Mortal Wkly Rep **52**(41): 986-7.
- Ambinder, R. F. (2003). "Epstein-Barr virus-associated lymphoproliferative disorders." Rev Clin Exp Hematol **7**(4): 362-74.
- Anantharaman, D., P. M. Chaubal, et al. (2007). "Susceptibility to oral cancer by genetic polymorphisms at CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 loci among Indians: tobacco exposure as a risk modulator." Carcinogenesis **28**(7): 1455-62.
- Barzal-Nowosielska, M., A. Miasko, et al. (2001). "Detection of human papillomavirus in papillomas of oral cavity." Folia Histochem Cytobiol **39 Suppl 2**: 189-90.
- Battino, M., M. S. Ferreira, et al. (2002). "The antioxidant capacity of saliva." J Clin Periodontol **29**(3): 189-94.
- Begum, S., D. Cao, et al. (2005). "Tissue distribution of human papillomavirus 16 DNA integration in patients with tonsillar carcinoma." Clin Cancer Res **11**(16): 5694-9.
- Berger, A., C. Drosten, et al. (2004). "Severe acute respiratory syndrome (SARS)--paradigm of an emerging viral infection." J Clin Virol **29**(1): 13-22.
- Blackstock, W. P. and M. P. Weir (1999). "Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins." Trends Biotechnol **17**(3): 121-7.
- Bohring, C. and W. Krause (1999). "The characterization of human spermatozoa membrane proteins--surface antigens and immunological infertility." Electrophoresis **20**(4-5): 971-6.
- Bouda, M., V. G. Gorgoulis, et al. (2000). ""High risk" HPV types are frequently detected in potentially malignant and malignant oral lesions, but not in normal oral mucosa." Mod Pathol **13**(6): 644-53.
- Britt, W. J. and S. Boppana (2004). "Human cytomegalovirus virion proteins." Hum Immunol **65**(5): 395-402.
- Carlson, K. A., P. Ciborowski, et al. (2004). "Proteomic fingerprinting of HIV-1-infected human monocyte-derived macrophages: a preliminary report." J Neuroimmunol **147**(1-2): 35-42.
- Chang, F., S. Syrjanen, et al. (1991). "Human papillomavirus (HPV) infections and their associations with oral disease." J Oral Pathol Med **20**(7): 305-17.
- Chen, C. H. (2008). "Review of a current role of mass spectrometry for proteome research." Anal Chim Acta **624**(1): 16-36.
- Choi, Y. W., Y. J. Tan, et al. (2004). "Proteomic approach identifies HSP27 as an interacting partner of the hepatitis C virus NS5A protein." Biochem Biophys Res Commun **318**(2): 514-9.
- Cohen, J. I. (1999). "The biology of Epstein-Barr virus: lessons learned from the virus and the host." Curr Opin Immunol **11**(4): 365-70.
- Cruz, I., A. J. Van Den Brule, et al. (2000). "No direct role for Epstein-Barr virus in oral carcinogenesis: a study at the DNA, RNA and protein levels." Int J Cancer **86**(3): 356-61.
- D'Costa, J., D. Saranath, et al. (1998). "Detection of HPV-16 genome in human oral cancers and potentially malignant lesions from India." Oral Oncol **34**(5): 413-20.
- Davy, C. E., D. J. Jackson, et al. (2002). "Identification of a G(2) arrest domain in the E1 wedge E4 protein of human papillomavirus type 16." J Virol **76**(19): 9806-18.
- De Smet, K. and R. Contreras (2005). "Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins." Biotechnol Lett **27**(18): 1337-47.
- de Villiers, E. M. (1989). "Heterogeneity of the human papillomavirus group." J Virol **63**(11): 4898-903.
- de Villiers, E. M., C. Fauquet, et al. (2004). "Classification of papillomaviruses." Virology **324**(1): 17-27.
- Dickson, R. C. (1997). "Clinical manifestations of hepatitis C." Clin Liver Dis **1**(3): 569-85.

- Dodds, M. W., D. A. Johnson, et al. (2005). "Health benefits of saliva: a review." *J Dent* **33**(3): 223-33.
- Doorbar, J. (2005). "The papillomavirus life cycle." *J Clin Virol* **32 Suppl 1**: S7-15.
- Doorbar, J., S. Ely, et al. (1991). "Specific interaction between HPV-16 E1-E4 and cytokeratins results in collapse of the epithelial cell intermediate filament network." *Nature* **352**(6338): 824-7.
- Drake, R. R., L. H. Cazare, et al. (2005). "Serum, salivary and tissue proteomics for discovery of biomarkers for head and neck cancers." *Expert Rev Mol Diagn* **5**(1): 93-100.
- Fields BN, K. D., Howley PM (1996). "Fields Virology." Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
- Flaitz, C. M. and M. J. Hicks (1998). "Molecular piracy: the viral link to carcinogenesis." *Oral Oncol* **34**(6): 448-53.
- Fontaine-Rodriguez, E. C., T. J. Taylor, et al. (2004). "Proteomics of herpes simplex virus infected cell protein 27: association with translation initiation factors." *Virology* **330**(2): 487-92.
- Frisch, M., H. Hjalgrim, et al. (2000). "Changing patterns of tonsillar squamous cell carcinoma in the United States." *Cancer Causes Control* **11**(6): 489-95.
- Gandhi, M. K. and R. Khanna (2004). "Human cytomegalovirus: clinical aspects, immune regulation, and emerging treatments." *Lancet Infect Dis* **4**(12): 725-38.
- Gasco, M. and T. Crook (2003). "The p53 network in head and neck cancer." *Oral Oncol* **39**(3): 222-31.
- Gonzalez-Moles, M. A., J. Gutierrez, et al. (2002). "Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP-1) expression in oral squamous cell carcinoma." *Laryngoscope* **112**(3): 482-7.
- Greco, A., W. Bienvenut, et al. (2001). "Identification of ribosome-associated viral and cellular basic proteins during the course of infection with herpes simplex virus type 1." *Proteomics* **1**(4): 545-9.
- Greer, C. E., C. M. Wheeler, et al. (1995). "Human papillomavirus (HPV) type distribution and serological response to HPV type 6 virus-like particles in patients with genital warts." *J Clin Microbiol* **33**(8): 2058-63.
- Guo, T., P. A. Rudnick, et al. (2006). "Characterization of the human salivary proteome by capillary isoelectric focusing/nanoreversed-phase liquid chromatography coupled with ESI-tandem MS." *J Proteome Res* **5**(6): 1469-78.
- HAMDAN, M. H. (2007). OVERVIEW. *CANCER BIOMARKERS Analytical Techniques for Discovery* I. John Wiley & Sons: 1-19.
- Hardt, M., L. R. Thomas, et al. (2005). "Toward defining the human parotid gland salivary proteome and peptidome: identification and characterization using 2D SDS-PAGE, ultrafiltration, HPLC, and mass spectrometry." *Biochemistry* **44**(8): 2885-99.
- Hebner, C. M. and L. A. Laimins (2006). "Human papillomaviruses: basic mechanisms of pathogenesis and oncogenicity." *Rev Med Virol* **16**(2): 83-97.
- Ho, T., Q. Wei, et al. (2007). "Epidemiology of carcinogen metabolism genes and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck." *Head Neck* **29**(7): 682-99.
- Hoory, T., A. Monie, et al. (2008). "Molecular epidemiology of human papillomavirus." *J Formos Med Assoc* **107**(3): 198-217.
- Hsieh, L. L., P. F. Wang, et al. (2001). "Characteristics of mutations in the p53 gene in oral squamous cell carcinoma associated with betel quid chewing and cigarette smoking in Taiwanese." *Carcinogenesis* **22**(9): 1497-503.
- Hu, S., Y. Xie, et al. (2005). "Large-scale identification of proteins in human salivary proteome by liquid chromatography/mass spectrometry and two-dimensional gel electrophoresis-mass spectrometry." *Proteomics* **5**(6): 1714-28.
- Hu, S. e. a. (2007). Oral cancer proteomics for the biomarker discovery.

- Humphrey, S. P. and R. T. Williamson (2001). "A review of saliva: normal composition, flow, and function." J Prosthet Dent **85**(2): 162-9.
- Iamaroon, A., K. Pattanaporn, et al. (2004). "Analysis of 587 cases of oral squamous cell carcinoma in northern Thailand with a focus on young people." Int J Oral Maxillofac Surg **33**(1): 84-8.
- Ibieta, B. R., M. Lizano, et al. (2005). "Human papilloma virus in oral squamous cell carcinoma in a Mexican population." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **99**(3): 311-5.
- Kademani, D., R. B. Bell, et al. (2005). "Prognostic factors in intraoral squamous cell carcinoma: the influence of histologic grade." J Oral Maxillofac Surg **63**(11): 1599-605.
- Kang, X., Y. Xu, et al. (2005). "Proteomic fingerprints for potential application to early diagnosis of severe acute respiratory syndrome." Clin Chem **51**(1): 56-64.
- Kawaguchi, Y., T. Matsumura, et al. (1999). "Cellular elongation factor 1delta is modified in cells infected with representative alpha-, beta-, or gammaherpesviruses." J Virol **73**(5): 4456-60.
- Kay, R., C. Barton, et al. (2008). "Enrichment of low molecular weight serum proteins using acetonitrile precipitation for mass spectrometry based proteomic analysis." Rapid Commun Mass Spectrom **22**(20): 3255-60.
- Kim, W., S. Oe Lim, et al. (2003). "Comparison of proteome between hepatitis B virus- and hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma." Clin Cancer Res **9**(15): 5493-500.
- Kimberlin, D. W. and R. J. Whitley (2005). "Neonatal herpes: what have we learned." Semin Pediatr Infect Dis **16**(1): 7-16.
- Lewis, S. J. and G. D. Smith (2005). "Alcohol, ALDH2, and esophageal cancer: a meta-analysis which illustrates the potentials and limitations of a Mendelian randomization approach." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **14**(8): 1967-71.
- Longworth, M. S. and L. A. Laimins (2004). "Pathogenesis of human papillomaviruses in differentiating epithelia." Microbiol Mol Biol Rev **68**(2): 362-72.
- Maeda, T., H. Hiranuma, et al. (1998). "Epstein-Barr virus infection and response to radiotherapy in squamous cell carcinoma of the oral cavity." Cancer Lett **125**(1-2): 25-30.
- McMurray, H. R., D. Nguyen, et al. (2001). "Biology of human papillomaviruses." Int J Exp Pathol **82**(1): 15-33.
- Miller, C. S. and B. M. Johnstone (2001). "Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **91**(6): 622-35.
- Mizukawa, N., K. Sugiyama, et al. (1999). "Defensin-1, an antimicrobial peptide present in the saliva of patients with oral diseases." Oral Dis **5**(2): 139-42.
- Muscardin, L. M., F. Poggiali, et al. (2001). "HPV5b variant in a neoplastic lesion of an Italian patient affected by epidermodysplasia verruciformis." Eur J Dermatol **11**(6): 572-5.
- Nagpal, J. K. and B. R. Das (2003). "Oral cancer: reviewing the present understanding of its molecular mechanism and exploring the future directions for its effective management." Oral Oncol **39**(3): 213-21.
- Nandakumar, M. P. and M. R. Marten (2002). "Comparison of lysis methods and preparation protocols for one- and two-dimensional electrophoresis of *Aspergillus oryzae* intracellular proteins." Electrophoresis **23**(14): 2216-22.
- Narisawa-Saito, M. and T. Kiyono (2007). "Basic mechanisms of high-risk human papillomavirus-induced carcinogenesis: roles of E6 and E7 proteins." Cancer Sci **98**(10): 1505-11.
- Opitz, O. G., Y. Suliman, et al. (2001). "Cyclin D1 overexpression and p53 inactivation immortalize primary oral keratinocytes by a telomerase-independent mechanism." J Clin Invest **108**(5): 725-32.
- Pelucchi, C., S. Gallus, et al. (2006). "Cancer risk associated with alcohol and tobacco use: focus on upper aero-digestive tract and liver." Alcohol Res Health **29**(3): 193-8.

- Petricoin, E. F., A. M. Ardekani, et al. (2002). "Use of proteomic patterns in serum to identify ovarian cancer." Lancet **359**(9306): 572-7.
- Pirkle, J. L., J. T. Bernert, et al. (2006). "Trends in the exposure of nonsmokers in the U.S. population to secondhand smoke: 1988-2002." Environ Health Perspect **114**(6): 853-8.
- Prichard, M. N., M. E. Penfold, et al. (2001). "A review of genetic differences between limited and extensively passaged human cytomegalovirus strains." Rev Med Virol **11**(3): 191-200.
- Psyrr, A. and D. DiMaio (2008). "Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer." Nat Clin Pract Oncol **5**(1): 24-31.
- Rapp, L. and J. J. Chen (1998). "The papillomavirus E6 proteins." Biochim Biophys Acta **1378**(1): F1-19.
- Remmerbach, T. W., U. G. Brinckmann, et al. (2004). "PCR detection of human papillomavirus of the mucosa: comparison between MY09/11 and GP5+/6+ primer sets." J Clin Virol **30**(4): 302-8.
- Rhodus, N. L., B. Cheng, et al. (2005). "The feasibility of monitoring NF-kappaB associated cytokines: TNF-alpha, IL-1alpha, IL-6, and IL-8 in whole saliva for the malignant transformation of oral lichen planus." Mol Carcinog **44**(2): 77-82.
- Rous, P. (1979). "A transmissible avian neoplasm. (Sarcoma of the common fowl) by Peyton Rous, M.D., Experimental Medicine for Sept. 1, 1910, vol. 12, pp.696-705." J Exp Med **150**(4): 738-53.
- Salazar, O. and J. A. Asenjo (2007). "Enzymatic lysis of microbial cells." Biotechnol Lett **29**(7): 985-94.
- Sand, L. P., J. Jalouli, et al. (2002). "Prevalence of Epstein-Barr virus in oral squamous cell carcinoma, oral lichen planus, and normal oral mucosa." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **93**(5): 586-92.
- Schipper, R. G., E. Silletti, et al. (2007). "Saliva as research material: biochemical, physicochemical and practical aspects." Arch Oral Biol **52**(12): 1114-35.
- Schlee, M., T. Krug, et al. (2004). "Identification of Epstein-Barr virus (EBV) nuclear antigen 2 (EBNA2) target proteins by proteome analysis: activation of EBNA2 in conditionally immortalized B cells reflects early events after infection of primary B cells by EBV." J Virol **78**(8): 3941-52.
- Schliephake, H. (2003). "Prognostic relevance of molecular markers of oral cancer--a review." Int J Oral Maxillofac Surg **32**(3): 233-45.
- Schrader, M. and P. Schulz-Knappe (2001). "Peptidomics technologies for human body fluids." Trends Biotechnol **19**(10 Suppl): S55-60.
- Schulte, I., H. Tammen, et al. (2005). "Peptides in body fluids and tissues as markers of disease." Expert Rev Mol Diagn **5**(2): 145-57.
- Scully, C. (2002). "Oral squamous cell carcinoma; from an hypothesis about a virus, to concern about possible sexual transmission." Oral Oncol **38**(3): 227-34.
- Scully, C. (2005). "Oral cancer; the evidence for sexual transmission." Br Dent J **199**(4): 203-7.
- Scully, C., S. Prime, et al. (1985). "Papillomaviruses: their possible role in oral disease." Oral Surg Oral Med Oral Pathol **60**(2): 166-74.
- Seitz, H. K. and P. Becker (2007). "Alcohol metabolism and cancer risk." Alcohol Res Health **30**(1): 38-41, 44-7.
- Shillitoe, E. J. (2009). "The role of viruses in squamous cell carcinoma of the oropharyngeal mucosa." Oral Oncol **45**(4-5): 351-5.
- Shimakage, M., K. Horii, et al. (2002). "Association of Epstein-Barr virus with oral cancers." Hum Pathol **33**(6): 608-14.
- Shope RE, H. E. (1933). "Infectious papillomatosis of rabbits; with a note on the histopathology." J Exp Med: 607-624.

- Singh, B. (2008). "Molecular pathogenesis of head and neck cancers." *J Surg Oncol* **97**(8): 634-9.
- Smith, E. M., J. M. Ritchie, et al. (2004). "Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers." *Int J Cancer* **108**(5): 766-72.
- Soares, C. P., I. Malavazi, et al. (2002). "[Presence of human papillomavirus in malignant oral lesions]." *Rev Soc Bras Med Trop* **35**(5): 439-44.
- Steben, M. and E. Duarte-Franco (2007). "Human papillomavirus infection: epidemiology and pathophysiology." *Gynecol Oncol* **107**(2 Suppl 1): S2-5.
- Sturgis, E. M. and P. M. Cinciripini (2007). "Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers?" *Cancer* **110**(7): 1429-35.
- Sugerman, P. B. and E. J. Shillitoe (1997). "The high risk human papillomaviruses and oral cancer: evidence for and against a causal relationship." *Oral Dis* **3**(3): 130-47.
- Sugiyama, M., U. K. Bhawal, et al. (2003). "Detection of human papillomavirus-16 and HPV-18 DNA in normal, dysplastic, and malignant oral epithelium." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **95**(5): 594-600.
- Summersgill, K. F., E. M. Smith, et al. (2000). "p53 polymorphism, human papillomavirus infection in the oral cavity, and oral cancer." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **90**(3): 334-9.
- Syrjanen, S. (2005). "Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer." *J Clin Virol* **32** Suppl 1: S59-66.
- Tao, X., Y. Huang, et al. (2007). "Assessment of local angiogenesis and vascular endothelial growth factor in the patients with atrophic-erosive and reticular oral lichen planus." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **103**(5): 661-9.
- Taylor, T. J. and D. M. Knipe (2004). "Proteomics of herpes simplex virus replication compartments: association of cellular DNA replication, repair, recombination, and chromatin remodeling proteins with ICP8." *J Virol* **78**(11): 5856-66.
- Termine, N., V. Panzarella, et al. (2008). "HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis (1988-2007)." *Ann Oncol* **19**(10): 1681-90.
- Toda, T., M. Sugimoto, et al. (2000). "Proteomic analysis of Epstein-Barr virus-transformed human B-lymphoblastoid cell lines before and after immortalization." *Electrophoresis* **21**(9): 1814-22.
- Uobe, K., K. Masuno, et al. (2001). "Detection of HPV in Japanese and Chinese oral carcinomas by in situ PCR." *Oral Oncol* **37**(2): 146-52.
- Van Nieuw Amerongen, A., J. G. Bolscher, et al. (2004). "Salivary proteins: protective and diagnostic value in cariology?" *Caries Res* **38**(3): 247-53.
- Varnum, S. M., D. N. Streblow, et al. (2004). "Identification of proteins in human cytomegalovirus (HCMV) particles: the HCMV proteome." *J Virol* **78**(20): 10960-6.
- Venturi, B. d. R. M. C., Márcio Grillo; Lourenço, Simone de Queiroz Chaves (2004). "Oral squamous cell carcinoma-contribution of oncogenic virus and some molecular markers in the development and prognosis of the lesion: a review." *Rev Bras Otorrinolaringol*. **70**(3): 385-392.
- Vertes, K. V. A. T. A. (2008). *MEDICALAPPLICATIONS OF MASS SPECTROMETRY*. Amsterdam.
- Villa, L. L. (1997). "Human papillomaviruses and cervical cancer." *Adv Cancer Res* **71**: 321-41.
- Villanueva, J., D. R. Shaffer, et al. (2006). "Differential exoprotease activities confer tumor-specific serum peptidome patterns." *J Clin Invest* **116**(1): 271-84.
- Vitorino, R., S. de Moraes Guedes, et al. (2006). "Two-dimensional electrophoresis study of in vitro pellicle formation and dental caries susceptibility." *Eur J Oral Sci* **114**(2): 147-53.
- Vitorino, R., M. J. Lobo, et al. (2004). "Analysis of salivary peptides using HPLC-electrospray mass spectrometry." *Biomed Chromatogr* **18**(8): 570-5.

- Vitorino, R., M. J. Lobo, et al. (2005). "The role of salivary peptides in dental caries." Biomed Chromatogr **19**(3): 214-22.
- Vitorino, R., M. J. Lobo, et al. (2004). "Identification of human whole saliva protein components using proteomics." Proteomics **4**(4): 1109-15.
- Wadsworth, J. T., K. D. Somers, et al. (2004). "Serum protein profiles to identify head and neck cancer." Clin Cancer Res **10**(5): 1625-32.
- Walsh, D. and I. Mohr (2004). "Phosphorylation of eIF4E by Mnk-1 enhances HSV-1 translation and replication in quiescent cells." Genes Dev **18**(6): 660-72.
- Walz, A., K. Stuhler, et al. (2006). "Proteome analysis of glandular parotid and submandibular-sublingual saliva in comparison to whole human saliva by two-dimensional gel electrophoresis." Proteomics **6**(5): 1631-9.
- Warnakulasuriya, S., T. Soussi, et al. (2000). "Expression of p53 in oral squamous cell carcinoma is associated with the presence of IgG and IgA p53 autoantibodies in sera and saliva of the patients." J Pathol **192**(1): 52-7.
- Wilmarth, P. A., M. A. Riviere, et al. (2004). "Two-dimensional liquid chromatography study of the human whole saliva proteome." J Proteome Res **3**(5): 1017-23.
- Xie, H., N. L. Rhodus, et al. (2005). "A catalogue of human saliva proteins identified by free flow electrophoresis-based peptide separation and tandem mass spectrometry." Mol Cell Proteomics **4**(11): 1826-30.
- Yates, J. R., 3rd, A. Gilchrist, et al. (2005). "Proteomics of organelles and large cellular structures." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(9): 702-14.
- Yokoyama, A. and T. Omori (2003). "Genetic polymorphisms of alcohol and aldehyde dehydrogenases and risk for esophageal and head and neck cancers." Jpn J Clin Oncol **33**(3): 111-21.
- Yoshioka, N., H. Inoue, et al. (2000). "Isolation of transformation suppressor genes by cDNA subtraction: lumican suppresses transformation induced by v-src and v-K-ras." J Virol **74**(2): 1008-13.
- Zhang, Z. Y., P. Sdek, et al. (2004). "Human papillomavirus type 16 and 18 DNA in oral squamous cell carcinoma and normal mucosa." Int J Oral Maxillofac Surg **33**(1): 71-4.
- zur Hausen, H. (1996). "Papillomavirus infections--a major cause of human cancers." Biochim Biophys Acta **1288**(2): F55-78.
- zur Hausen, H. (1999). "Papillomaviruses in human cancers." Proc Assoc Am Physicians **111**(6): 581-7.
- zur Hausen, H. (2000). "Papillomaviruses causing cancer: evasion from host-cell control in early events in carcinogenesis." J Natl Cancer Inst **92**(9): 690-8.
- zur Hausen, H. (2002). "Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application." Nat Rev Cancer **2**(5): 342-50.
- .

Blast das proteínas identificadas

Individuo	Nome proteína	sequencia peptídica	Entry name	Identity	score
1	Tyrosine-protein kinase transforming protein Fgr OS=Feline sarcoma virus (strain Gardner-Rasheed) G	PRAVFPSIVGRPRHQGVVMVGMGQKDSYVGDEAQ	FGR_FSVGR	100	71
		TEAPLNPKANREKMTQI	FGR_FSVGR	100	38
		GQKDSYVGDEAQSKRGIL	FGR_FSVGR	100	39
		GMGQKDSYVGDEAQSKRGIL	FGR_FSVGR	100	43
		MVGMGQKDSYVGDEAQSKRGIL	FGR_FSVGR	100	47
		AGDDAPRAVFPSIVGRPR	FGR_FSVGR	100	40
		GFAGDDAPRAVFPS	FGR_FSVGR	100	33
		AGFAGDDAPRAVFPS	FGR_FSVGR	100	35
		AGDDAPRAVFPSIVGRP	FGR_FSVGR	100	38
		NELRVAPEEHPVLL	FGR_FSVGR	100	32
		YNELRVAPEEHPVLL	FGR_FSVGR	100	35
		AGDDAPRAVFPSIVG	FGR_FSVGR	100	34
		GFAGDDAPRAVFPSIVGRP	FGR_FSVGR	100	43
		AGDDAPRAVFPSIV	FGR_FSVGR	100	32
		AGFAGDDAPRAVFPSIVG	FGR_FSVGR	100	40
		FYNELRVAPEEHPVLL	FGR_FSVGR	100	37
		GFAGDDAPRAVFPSIV	FGR_FSVGR	100	36
	Uncharacterized protein L291 OS=Acanthamoeba polyphaga mimivirus GN=MIMI_L291 PE=4 SV=1	NYPIPYPTTYPTTY	YL291_MIMIV	100	52
			Q4S014_TETNG	90	34
		NYPIPYPTTYPTTY	YL291_MIMIV	100	52
			Q4S014_TETNG	90	34
		NYPIPYPTTYPTTY	YL291_MIMIV	100	52
			Q4S014_TETNG	90	34
		NYPIPYPTTYPTTY	YL291_MIMIV	100	52
			Q4S014_TETNG	90	34
2	Probable protein E4 OS=Human papillomavirus type 5 GN=E4 PE=4 SV=2	GPQPPAEGEVEGHPGGDQGHPPPPPPAPHNGHS	VE4_HPVO5	100	54
			VE4_HPVS5B	93	76
		PGGDQGHPPPPP	VE4_HPVO5	100	35
			VE4_HPVS5B	91	32
		PGGDQGHPPPPP	VE4_HPVO5	100	35
			VE4_HPVS5B	91	32
		PGGDQGHPPPPP	VE4_HPVO5	100	35
			VE4_HPVS5B	91	32
		PGGDQGHPPPPP	VE4_HPVO5	100	35
			VE4_HPVS5B	91	32
		PGGDQGHPPPPP	VE4_HPVO5	100	35
			VE4_HPVS5B	91	32
		PGGDQGHPPPPP	VE4_HPVO5	100	35
			VE4_HPVS5B	91	32
	Epstein-Barr nuclear antigen 2 OS=Epstein-Barr virus (strain B95-8) GN=EBNA2 PE=1 SV=1	AAPAQPPPGVIND	EBNA2_EBV	100	32
			EBNA2_EBVG	100	32
		PQGPQTAPQARLVQPHVPPL	EBNA2_EBV	100	47
			EBNA2_EBVG	95	44
		GVPPPLPPPPPP	EBNA2_EBV	100	34
			Q6H899_ORYSJ	91	33
			Q0E2T9_ORYSJ	91	33
			A3A4I8_ORYSJ	91	33
			A9URA4_MONBE	91	32
			Q4RER3_TETNG	91	32

Universidade de Aveiro Departamento de Química
2009

			Q9DQX5_HHV1	100	68
			Q09I78_HHV1	100	68
			ICP34_HHV1N	100	68
			ICP34_HHV1F	100	68
			B9VQC6_HHV1	93	65
			ICP34_HHV11	93	65
			Q1NNU5_9DELT	63	35
		PAGGPPSCSLLLRQWLQVPESASDDDD	ICP34_HHV1D	100	66
			Q09I78_HHV1	96	64
			B9VQC6_HHV1	96	64
			ICP34_HHV11	96	64
			ICP34_HHV1F	93	62
			ICP34_HHV1N	96	62
			Q9DQX5_HHV1	89	59
		PPGAGPGGGADPSHPPSRPFRLPPRL	ICP34_HHV1D	100	63
			B9VQC6_HHV1	96	61
			ICP34_HHV11	96	61
			Q9DQX5_HHV1	96	61
			Q09I78_HHV1	96	61
			ICP34_HHV1N	96	61
			ICP34_HHV1F	96	61
		GPRRPPPGPTGAVPTAQSQVTST	ICP34_HHV1D	100	54
			Q09I78_HHV1	100	54
			B9VQC6_HHV1	100	54
			ICP34_HHV1N	100	54
			ICP34_HHV1F	100	54
			ICP34_HHV11	100	54
			Q9DQX5_HHV1	100	52
		PAAAPPPPAGGPPSCSLLLRQWLQVPESASDDDD	ICP34_HHV1D	100	82
			Q09I78_HHV1	97	80
			B9VQC6_HHV1	97	80
			ICP34_HHV11	97	80
			ICP34_HHV1F	94	78
			Q9DQX5_HHV1	94	75
			ICP34_HHV1N	93	62
		PPPGAGPGGGADPSHPPSRPFRLPPRLALRLRVTAEHLA	ICP34_HHV1D	100	87
			B9VQC6_HHV1	97	85
			ICP34_HHV11	97	85
			Q09I78_HHV1	97	85
			ICP34_HHV1N	97	85
			ICP34_HHV1F	97	85
			Q9DQX5_HHV1	94	82
		PPAGGPPSCSLLLRQWLQVPESASDD	ICP34_HHV1D	100	62
			Q09I78_HHV1	96	60
			B9VQC6_HHV1	96	60
			ICP34_HHV11	96	60
			Q9DQX5_HHV1	92	58
			ICP34_HHV1F	92	58
			ICP34_HHV1N	92	57
		AAAPPPPAGGPPSCSLLLRQ	ICP34_HHV1D	100	52
			Q09I78_HHV1	100	52
			B9VQC6_HHV1	100	52
			ICP34_HHV11	100	52
			Q9DQX5_HHV1	95	49
			ICP34_HHV1F	95	49
			ICP34_HHV1N	96	36
			A4T5U4_MYCGI	85	32

			B3RZ44_TRIAD	85	32
		PAGGPPPSCSLLLRQWLQVPESASDD	ICP34_HHV1D	100	59
			Q09I78_HHV1	96	57
			B9VQC6_HHV1	96	57
			ICP34_HHV1I	96	57
			Q9DQX5_HHV1	92	55
			ICP34_HHV1F	92	55
			ICP34_HHV1N	96	55
		PGAGPGGGADPSHPPSRP	ICP34_HHV1D	100	45
			B9VQC6_HHV1	94	44
			ICP34_HHV1I	94	44
			Q9DQX5_HHV1	94	43
			Q09I78_HHV1	94	43
			ICP34_HHV1N	94	43
			ICP34_HHV1F	94	43
		PAGGPPPSCSLLLRQWLQVPESASDD	ICP34_HHV1D	100	59
			Q09I78_HHV1	96	57
			B9VQC6_HHV1	96	57
			ICP34_HHV1I	96	57
			Q9DQX5_HHV1	92	55
			ICP34_HHV1F	92	55
			ICP34_HHV1N	96	55
		PPPPAGGPPPSCSLLLRQWLQVPES	ICP34_HHV1D	100	62
			Q09I78_HHV1	96	60
			B9VQC6_HHV1	96	60
			ICP34_HHV1I	96	60
			Q9DQX5_HHV1	92	58
			ICP34_HHV1F	92	58
			ICP34_HHV1N	91	49
		PPAGGPPPSCSLLLRQWLQV	ICP34_HHV1D	100	48
			Q09I78_HHV1	95	46
			B9VQC6_HHV1	95	46
			ICP34_HHV1I	95	46
			Q9DQX5_HHV1	90	44
			ICP34_HHV1F	90	44
			ICP34_HHV1N	90	43
		PRPPGPTGAVPTAQSQVTST	ICP34_HHV1D	100	45
			Q09I78_HHV1	100	45
			B9VQC6_HHV1	100	45
			ICP34_HHV1N	100	45
			ICP34_HHV1F	100	45
			ICP34_HHV1I	100	45
			ICP34_HHV1D	100	45
		PGAGPGGGADPSHPPSRP	B9VQC6_HHV1	94	44
			ICP34_HHV1I	94	44
			Q9DQX5_HHV1	94	43
			Q09I78_HHV1	94	43
			ICP34_HHV1N	94	43
			ICP34_HHV1F	94	43
			ICP34_HHV1D	100	71
		PAAAPPPAGGPPPSCSLLLRQWLQVPESA	Q09I78_HHV1	96	69
			B9VQC6_HHV1	96	69
			ICP34_HHV1I	96	69
			Q9DQX5_HHV1	93	67
			ICP34_HHV1F	93	67
			ICP34_HHV1N	91	51
			ICP34_HHV1D	100	47
		GPRRPRPPGPTGAVPTAQSQ	ICP34_HHV1D	100	47

			Q09I78_HHV1	100	47
			B9VQC6_HHV1	100	47
			ICP34_HHV1N	100	47
			ICP34_HHV1F	100	47
			ICP34_HHV11	100	47
			Q9DQX5_HHV1	100	45
		PAGGPPPCSLLRQWLQVPESASDD	ICP34_HHV1D	100	59
			Q09I78_HHV1	96	57
			B9VQC6_HHV1	96	57
			ICP34_HHV11	96	57
			Q9DQX5_HHV1	92	55
			ICP34_HHV1F	92	55
			ICP34_HHV1N	96	55
			ICP34_HHV1D	100	45
			B9VQC6_HHV1	94	44
			ICP34_HHV11	94	44
			Q9DQX5_HHV1	94	43
			Q09I78_HHV1	94	43
		PPGAGPGGGADPSHPPSR	ICP34_HHV1N	94	43
			ICP34_HHV1F	94	43
			ICP34_HHV1D	100	47
			Q09I78_HHV1	100	47
			B9VQC6_HHV1	100	47
			ICP34_HHV1N	100	47
		GPRRPRPPGPTGAVPTAQSQ	ICP34_HHV1F	100	47
			ICP34_HHV11	100	47
			Q9DQX5_HHV1	100	45
			ICP34_HHV1D	100	47
			Q09I78_HHV1	100	47
			B9VQC6_HHV1	100	47
		PAAAPPPPAGGPPPCSL	ICP34_HHV1F	94	45
			ICP34_HHV11	100	47
			Q9DQX5_HHV1	94	45
			B9VQC6_HHV1	100	47
			ICP34_HHV1D	100	47
			Q09I78_HHV1	100	47
		PAAAPPPPAGGPPPCSL	ICP34_HHV1F	94	45
ICP34_HHV11	100		47		
Q9DQX5_HHV1	94		45		
B9VQC6_HHV1	100		47		
ICP34_HHV1D	100		47		
Q09I78_HHV1	100		47		
4	GTP-binding protein lepA OS=Cytophaga hutchinsonii (strain ATCC 33406 / NCIMB 9469) GN=lepA PE=3 SV	PPKGDPAKLQALIFDSQF	LEPA_CYTH3	100	43
	Translation initiation factor IF-2 OS=Solibacter usitatus (strain Ellin6076) GN=infB PE=3 SV=1	PAAAPKAAVEP	IF2_SOLUE	100	43
		PRPGVPKAPSAPVPGQPIYRGPIRPGQPMVAKPGVRPGMPP	IF2_SOLUE	100	93
		GPPPISEITISEGITVKELSEKLDVK	IF2_SOLUE	100	55
		PSSPAPGAPQRPQAIPRPQQVRPESQRPSPGAPSA	IF2_SOLUE	100	81
		PGVPKAPSAPVPGQPIYRGPIRPGQPMVA	IF2_SOLUE	100	66
		QPAAPRPGVPKAPSAPVPGQP	IF2_SOLUE	100	49
		GPPPISEITISEGITVKELSEKLDVK	IF2_SOLUE	100	55
		PKAPSAPVPGQPIYRGPIRPG	IF2_SOLUE	100	50
		PPRPEGPRAAPAPPLP	IF2_SOLUE	100	43
		PPQQVRPESQRPSPGAPSAQRPRLAGQPAARPVVPPR	IF2_SOLUE	100	83
		PPRPEGPRAAPAPPLPPAPQVPHAPSPAA	IF2_SOLUE	100	70
PRPGVPKAPSAPVPGQPIYRGPIRPGQPMVAKPGVRPGMPP	IF2_SOLUE	100	93		

5	Uncharacterized protein TP_0577 OS=Treponema pallidum GN=TP_0577 PE=4 SV=1	PRAPVMPQQAAPRPGVVKAPSAPVPGQPIYRGPIR	IF2_SOLUE	100	80
		GPPPISEITISEGITVKELSEKLDVK	IF2_SOLUE	100	55
		SAQPPPPAPAGTGA	Y577_TREPA	100	37
			B2S3G8_TREPS	93	35
5		GAPGPVPGPGVRVRR	VNUA_SUHVK	100	36
			Q69340_9ALPH	100	36
			Q5PPC8_9ALPH	100	36
		PGAGAHVVAHVVLAAEAQRLGPGV	VNUA_SUHVK	100	51
			Q69340_9ALPH	100	51
			Q5PPC8_9ALPH	100	51
		PGPGAGAHVVAHVVLAAEAQR	VNUA_SUHVK	100	46
			Q69340_9ALPH	100	46
			Q5PPC8_9ALPH	100	46
		PPAGGSARRRRRGGGPPGRGGR	VNUA_SUHVK	100	52
			Q5PPC8_9ALPH	100	52
			Q69340_9ALPH	91	47
		PPAGGSARRRRRGGGPPGRGG	VNUA_SUHVK	100	50
			Q5PPC8_9ALPH	100	50
			Q69340_9ALPH	91	45
		PRGPVGLHGAPGGGADAGLEGGKVPEHGRR	VNUA_SUHVK	100	69
			Q5PPC8_9ALPH	100	69
			Q69340_9ALPH	89	58
		PGVPVPGVVRRAEAVGEGGEQRREAA	VNUA_SUHVK	100	60
			Q69340_9ALPH	100	60
			Q5PPC8_9ALPH	100	60
		PGAAGPGRAALLLAPLGRWVRAGGGGAGVAGGAGEAGLGAGAG	VNUA_SUHVK	100	90
			Q69340_9ALPH	100	90
			Q5PPC8_9ALPH	100	90
		GAPGPVPGPGVVRRAEAVGE	VNUA_SUHVK	100	47
			Q69340_9ALPH	100	47
			Q5PPC8_9ALPH	100	47
		PGAAGPGRAALLLAPLGRWVRAGGGGAGVAGGAGEAGLGAGAG	VNUA_SUHVK	100	90
			Q69340_9ALPH	100	90
			Q5PPC8_9ALPH	100	90
		PGAAGPGRAALLLAPLGRWVRAGGGGAGVAGGAGEAGLGAGAG	VNUA_SUHVK	100	90
			Q69340_9ALPH	100	90
			Q5PPC8_9ALPH	100	90
		PGVQAGEGGLHAGEAGRAHDGARVQHGRAELAA	VNUA_SUHVK	100	71
			Q5PPC8_9ALPH	100	71
			Q69340_9ALPH	96	67
		PRGAGGGAGESESESGRAEGA	VNUA_SUHVK	100	45
			Q5PPC8_9ALPH	100	45
			Q69340_9ALPH	86	38
		PGAAGPGRAALLLAPLGRWVRAGGGGAGVAGGAGEAGLGAGAG	VNUA_SUHVK	100	90
			Q69340_9ALPH	100	90
			Q5PPC8_9ALPH	100	90
		ERAPEPVVLGGGGGGGQQ	VNUA_SUHVK	100	42
			Q5PPC8_9ALPH	100	42
			Q69340_9ALPH	100	38
		PGLTDRVPPRGGPSRPGCRGAGRAGGGG	B9G207_ORYSJ	86	32
			VNUA_SUHVK	100	66
			Q5PPC8_9ALPH	100	66
		PGAAGPGRAALLLAPLGRWVRAGGGGAGVAGGAGEAGLGAGAG	Q69340_9ALPH	89	56
			VNUA_SUHVK	100	90
			Q69340_9ALPH	100	90

		PGPRGGLGEPGRGHVGRGEEG	Q5PPC8_9ALPH	100	90
			VNUA_SUHVK	100	83
			Q5PPC8_9ALPH	100	83
			Q69340_9ALPH	95	48
		PGPGAGAHRVAHVVLAAEAQRLGPGVQAGEGGLHAGEAG	VNUA_SUHVK	100	83
			Q69340_9ALPH	100	83
			Q5PPC8_9ALPH	100	83
		PGAAGPGRAALLLAPLGRWVRAGGGGAGVAGGAGEAGLGAGAG	VNUA_SUHVK	100	90
			Q69340_9ALPH	100	90
			Q5PPC8_9ALPH	100	90
		PGPGAGAHRVAHVVLAAEAQRLGPGVQAGEGGLHAGEAG	VNUA_SUHVK	100	83
			Q69340_9ALPH	100	83
			Q5PPC8_9ALPH	100	83
		AGAGLGAGGAGGPGAGEAGGGARRRRRRRW	VNUA_SUHVK	100	67
			Q69340_9ALPH	100	67
			Q5PPC8_9ALPH	100	67
		PGAAGPGRAALLLAPLGRWVRAGGGGAGVAGGAGEAGLGAGAG	VNUA_SUHVK	100	36
			Q69340_9ALPH	100	90
			Q5PPC8_9ALPH	100	90
	Probable protein E4 OS=Human papillomavirus type 5b GN=E4 PE=4 SV=1	PGPGRRSARLGPLQADRDPGEGPQ	VE4_HPVS5B	100	67
			VE4_HPVS5	100	67
		KQTQTTPPPPPPPPPQPLTPRDSPPH	VE4_HPVS5B	100	67
			Q6LCS3_HPVS36	96	64
			Q84275_HPVS47	92	61
			VE4_HPVS47	84	49
			Q6LCS5_HPVS20	84	49
			Q6LCS4_HPVS21	84	49
			VE4_HPVS08	88	48
		PPPGPGRRSARLGPLQADRDPGEGPQVPAEGEVE	O40621_HPVS7	86	45
			VE4_HPVS5B	100	79
		PGRAPSPKPTPLGPPPGPGPR	VE4_HPVS5	91	71
			VE4_HPVS5B	100	53
			VE4_HPVS5	95	51
	Probable protein E4 OS=Human papillomavirus type 5 GN=E4 PE=4 SV=2	PPPGPGRRSPR	VE4_HPVS5	100	32
		GPQPPAEGEVEGHPGGDQGHPPPPPPAPHNG	VE4_HPVS5	100	78
			VE4_HPVS5B	93	72
		PEEGTDGGPP	VE4_HPVS5	100	48
		PGPGRRSPRLGPLQADRD	VE4_HPVS5	100	48
			VE4_HPVS5B	95	45
		PSPKPTPLGPPPGPGRRSPRLGPLQA	VE4_HPVS5	100	64
			VE4_HPVS5B	96	61
	Probable protein E4 OS=Human papillomavirus type 47 GN=E4 PE=4 SV=1	QGPPPDLPAPPVEGEVEGHPQGKDRDHPPPTPQ	VE4_HPVS47	100	80
			Q84275_HPVS47	100	80
		PGQGPDPDLAPPVEGEVEGHPQGKDRDHPP	VE4_HPVS47	100	75
			Q84275_HPVS47	100	75
	Epstein-Barr nuclear antigen 2 OS=Epstein-Barr virus (strain B95-8) GN=EBNA2 PE=1 SV=1	TLTVPRPTRPTTLPTPLTLVLRPTLQPTPS	EBNA2_EBV	100	74
			EBNA2_EBVS	100	74
		GHGLASAMRMLWMANYIVRQSRGD	EBNA2_EBV	100	56
			EBNA2_EBVS	100	56
		PPPPPPPPPPQRRDAWTQEP	EBNA2_EBV	100	53
			Q69022_EBVS	95	52
			EBNA2_EBVS	100	48
			Q9QEJ3_9GAMA	85	46
			Q07701_CHVS12	85	44
			Q9QSL3_9GAMA	77	41
			Q7SEJ5_NEUCR	92	38
		PPPPPPPPPPQRRDAWTQEPSPLDR	EBNA2_EBV	100	58

			EBNA2_EBVG	100	56	
			Q69022_EBVG	90	53	
			GENTGVPPPLPPPPPPPPPPPPPPPP	EBNA2_EBV	100	75
			PPTPLPATLTVPPRTRPTTLPT	EBNA2_EBV	100	59
			EBNA2_EBVG	100	59	
6	Probable nuclear antigen OS=Suid herpesvirus 1 (strain Kaplan) PE=4 SV=1	LAGVPGA AVADA AVGRR	VNUA_SUHVK	100	35	
			Q69340_9ALPH	100	35	
			Q5PPC8_9ALPH	100	35	
		PGPGAGAH RV AHVVLAAEAQRLGPGVQAGEGGL	VNUA_SUHVK	100	70	
			Q69340_9ALPH	100	70	
			Q5PPC8_9ALPH	100	70	
		RPGPGAGPGGPEDEVTLGA	VNUA_SUHVK	100	49	
			Q69340_9ALPH	100	49	
			Q5PPC8_9ALPH	100	49	
			B6LD13_BRAFL	85	33	
			Q0RM06_FRAAA	92	33	
			Q5CHY8_CRYHO	100	33	
		RPGPGAGPGGPEDEVTLGALMESPTGGPGGRGPLV	VNUA_SUHVK	100	85	
			Q69340_9ALPH	100	85	
			Q5PPC8_9ALPH	100	85	
		PGAGVRGAARVGHVGVGPAEALQDEGLLGAIVAAAHHGHAHRV	VNUA_SUHVK	100	90	
			Q69340_9ALPH	100	90	
			Q5PPC8_9ALPH	100	90	
		PPPAGGSARRRRGGGPPRGRRRGKKRRRAEGT	VNUA_SUHVK	100	78	
			Q5PPC8_9ALPH	100	78	
			Q69340_9ALPH	94	73	
		PGPAHGALGGRVQADADV VVPHGRAVRGP	VNUA_SUHVK	100	68	
			Q5PPC8_9ALPH	100	68	
			Q69340_9ALPH	96	63	
		LLVHEGAGHLGRAVGEGRLGGPRRVGLAGRDAAEA AVGRGVLG	VNUA_SUHVK	100	90	
			Q5PPC8_9ALPH	100	90	
			Q69340_9ALPH	97	87	
		HGRAELAAPGPAHGALGGRVQADADV VVPHGRAVRGPVLD	VNUA_SUHVK	100	89	
			Q5PPC8_9ALPH	100	89	
			Q69340_9ALPH	95	79	
		PGAGVRGAARVGHV	VNUA_SUHVK	100	32	
			Q69340_9ALPH	100	32	
			Q5PPC8_9ALPH	100	32	
		GHGPGRGAVAGRGLADV LVPEP	VNUA_SUHVK	100	51	
			Q69340_9ALPH	100	51	
			Q5PPC8_9ALPH	100	51	
		PGAGVRGAARVGHVGVGPAEALQDEGL	VNUA_SUHVK	100	58	
			Q69340_9ALPH	100	58	
			Q5PPC8_9ALPH	100	58	
		PPPPPPQPPP	VNUA_SUHVK	100	33	
		PPPPPPQPPP	VNUA_SUHVK	100	36	
		PPPPPPQPPAG	VNUA_SUHVK	100	42	
		PPAGGSARRRRGGGPPRGGR	VNUA_SUHVK	100	52	
			Q5PPC8_9ALPH	100	52	
			Q69340_9ALPH	91	47	
		PPPPPPQPPP	VNUA_SUHVK	100	36	
		RPPPRWPPSPQKIS ET	VNUA_SUHVK	100	43	
			Q69340_9ALPH	100	43	
			Q5PPC8_9ALPH	100	43	
		PERGALAGHVLA AVHGGEHA	VNUA_SUHVK	100	45	
			Q69340_9ALPH	100	45	
			Q5PPC8_9ALPH	100	45	

		PGPRGGLGEPGRGHVGRGEEGRGVGPGLLAGA	VNUA_SUHVK	100	73
			Q5PPC8_9ALPH	100	73
			Q69340_9ALPH	96	70
		GEGDRGTAGGGEGDRDDPPPPSPPPRPPPLPPPPPPPPQPPP	VNUA_SUHVK	100	112
			Q5PPC8_9ALPH	100	112
			Q69340_9ALPH	95	102
		PPPPPPPPQPPAGGSARRRRRGGGPPGRGGRR	VNUA_SUHVK	100	82
			Q5PPC8_9ALPH	100	82
			Q69340_9ALPH	94	77
		HGPGRGAVAGRGLADVVLVPEPLAGVPGAADAAGRRVAGAGPLPE	VNUA_SUHVK	100	99
			Q69340_9ALPH	100	99
			Q5PPC8_9ALPH	100	99
		PGPRGGLGEPGRGHVGRGEEG	VNUA_SUHVK	100	51
			Q5PPC8_9ALPH	100	51
			Q69340_9ALPH	95	48
		PPPPPPPPQPPAGGSARRRRRGGGPPGRGGRRRGKKRRRAEG	VNUA_SUHVK	100	73
			Q69340_9ALPH	100	73
			Q5PPC8_9ALPH	100	73
		GRQALGAAELGEAPAAAGDEDGPQRGAEPVAVGRA	VNUA_SUHVK	100	73
			Q69340_9ALPH	100	73
			Q5PPC8_9ALPH	100	73
Probable protein E4 OS=Human papillomavirus type 5 GN=E4 PE=4 SV=2		TPPPRPPPPQPPLTP	VE4_HPVO5	100	43
			Q84275_HP47	100	43
			Q6LCS3_HP36	100	43
			VE4_HP45B	100	43
		TPPPRPPPPQPPLTPRDSPPHQ	VE4_HP47	100	43
			VE4_HPVO5	100	61
			VE4_HP45B	100	61
			Q6LCS3_HP36	95	58
		GEGGDEEGHPPPPPPTNGHEGGLSSVASLL	Q84275_HP47	90	53
			VE4_HP47	90	53
			VE4_HPVO5	100	73
			VE4_HP45B	93	69
Epstein-Barr nuclear antigen 2 OS=Epstein-Barr virus (strain B95-8) GN=EBNA2 PE=1 SV=1		PPQRRDAWTQEPSPLDRDPLGYDVGHGGL	EBNA2_EBV	100	72
			EBNA2_EBVG	96	69
		PPAAPAQPPPGVINDQQLHHLPSGPPWWPPICDPPQPSKTQ	EBNA2_EBV	100	100
			EBNA2_EBVG	100	100
		PPPAAPAQPPPGVINDQQLHHLPSGPPWWPPICDPPQPSKTQ	EBNA2_EBV	100	103
			EBNA2_EBVG	100	103
		GVPPPLPPPPPP	EBNA2_EBV	100	34
			Q6H899_ORYSJ	91	33
			Q0E2T9_ORYSJ	91	33
			A3A4I8_ORYSJ	91	33
			A9URA4_MONBE	91	32
			Q4RER3_TETNG	91	32
			Q9SEG2_MAIZE	100	32
			C0P7I2_MAIZE	100	32
			B6U0U0_MAIZE	100	32
			Q4CTN2_TRYCR	91	32
			Q4CRG6_TRYCR	91	32
			Q4PFH2_USTMA	91	32
		PPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPPQ	EBNA2_EBV	100	75
			EBNA2_EBVG	100	42
		GHGLASAMRMLWMANYI	EBNA2_EBV	100	42
			EBNA2_EBVG	100	42
		RMLWMANYIVRQSRGDRGLILPQGPQTAPQAR	EBNA2_EBV	100	69
			EBNA2_EBVG	100	67
		PPPPPPQRRDAWTQEPSPLDRDPLGYDVG	EBNA2_EBV	100	70

		EPESHNSPEAPILFPDDWYPPSIDPADLDESWDYIFET	EBNA2_EBVG	96	67
			EBNA2_EBV	100	89
			Q69018_EBVG	100	89
			EBNA2_EBVG	100	89
	Probable protein E4 OS=Human papillomavirus type 5b GN=E4 PE=4 SV=1	LGPGRAPSPKPTP	VE4_HPVS5B	100	33
	Uncharacterized 94.0 kDa protein in POL-LEF3 intergenic region OS=Autographa californica nuclear po	PPPPPPQPPAPPQPPYNNYPYPPYPF	Y066_NPVAC	100	76
	Viral myc transforming protein OS=Avian myelocytomatosis virus MC29 GN=MYC PE=3 SV=2	SRPGPPPSGPPPPAGPAA	MYC_AVIMC	100	48
			Q995G8_ALV	100	48
			Q85456_9RETR	100	48
			Q00089_9RETR	100	48
			O56221_9RETR	100	48
			MYC_CHICK	100	48
			MYC_AVIOK	100	48
			MYC_AVIMH	100	48
			MYC_AVIME	100	48
			MYC_AVIMD	100	48
			MYC_AVIM2	100	48
		PGPPPSGPPPPAGPAASAGLYLHDLGA	MYC_AVIMC	100	66
			Q995G8_ALV	100	66
			Q00089_9RETR	100	66
			O56221_9RETR	100	66
			MYC_CHICK	100	66
			MYC_AVIOK	100	66
			MYC_AVIMH	100	66
			MYC_AVIME	100	66
			MYC_AVIMD	100	66
			MYC_AVIM2	100	66
			Q85456_9RETR	96	64
	Probable protein E4 OS=Human papillomavirus type 47 GN=E4 PE=4 SV=1	PPAGPAASAGLYLHDLGAAAADCIDPSVVFYPLSERAPRAAPP	MYC_AVIMC	100	95
			Q995G8_ALV	100	95
			Q00089_9RETR	100	95
			O56221_9RETR	100	95
			MYC_CHICK	100	95
			MYC_AVIOK	100	95
			MYC_AVIMD	100	95
			MYC_AVIM2	100	95
			Q64810_9RETR	100	77
			Q64809_9RETR	100	77
		PPPPTGGLRRSTRVLVPGQGPPDLPA	Q84275_HPVS47	100	67
			VE4_HPVS47	100	67
7	Probable nuclear antigen OS=Suid herpesvirus 1 (strain Kaplan) PE=4 SV=1	RGAEPVAVGRAVPEGGA	Q69340_9ALPH	100	38
			Q5PPC8_9ALPH	100	38
			VNUA_SUHVK	100	38
		PGPGPEDEVTVLGALMESP	Q69340_9ALPH	100	43
			Q5PPC8_9ALPH	100	43
			VNUA_SUHVK	100	43
		GAPGPVPGVVRVRAEAVGEG	Q69340_9ALPH	100	49
			Q5PPC8_9ALPH	100	49
			VNUA_SUHVK	100	49
		PGPGVVRVRAEAVGEGGEQRRE	Q69340_9ALPH	100	48

			Q5PPC8_9ALPH	100	48
			VNUA_SUHVK	100	48
		PGARGPRGPVGLHGAPGGGADAGLEGGKVP	Q5PPC8_9ALPH	100	68
			VNUA_SUHVK	100	68
		GPVPGPGVRRRAEAVGEGGEQRREAAARV	Q69340_9ALPH	100	64
			Q5PPC8_9ALPH	100	64
			VNUA_SUHVK	100	64
		HGAPGGGADAGLEGGKVPEHGRRG	Q5PPC8_9ALPH	100	56
			VNUA_SUHVK	100	56
		PGRGHVGRGEEGRGVGPGGLAGAGPVHAV	Q5PPC8_9ALPH	100	66
			VNUA_SUHVK	100	66
			Q69340_9ALPH	96	63
		PGPGVRRRAEAVGEGG	Q69340_9ALPH	100	38
			Q5PPC8_9ALPH	100	38
			VNUA_SUHVK	100	38
		PRGPVGLHGAPGGGADAGLEGGKV	Q5PPC8_9ALPH	100	55
			VNUA_SUHVK	100	55
			Q69340_9ALPH	91	46
		PPAGGSARRRRRGGGPPGRGGR	Q5PPC8_9ALPH	100	52
			VNUA_SUHVK	100	52
			Q69340_9ALPH	91	47
		SPPPRPPPLPPPPPPPPQPPAGGSARRRRRG	Q69340_9ALPH	100	86
			Q5PPC8_9ALPH	100	86
			VNUA_SUHVK	100	86
		HGAPGGGADAGLEGGKVPEHGRRGARGGDGAR	Q5PPC8_9ALPH	100	72
			VNUA_SUHVK	100	72
		PGGPEDEVTVLGALMESPTGGPG	Q69340_9ALPH	100	55
			Q5PPC8_9ALPH	100	55
			VNUA_SUHVK	100	55
		PPAGGSARRRRRGGGPPGRGG	Q5PPC8_9ALPH	100	50
			VNUA_SUHVK	100	50
			Q69340_9ALPH	91	45
		PPPPPPPPQPPAG	Q69340_9ALPH	100	42
			Q5PPC8_9ALPH	100	42
			VNUA_SUHVK	100	42
			Q3TWU8_MOUSE	93	40
			Q0DTY5_ORYSJ	93	40
			Q4DD51_TRYCR	93	40
			ZIC5_HUMAN	93	40
			U497F_VITVI	93	40
			PXK_RAT	93	40
			PXK_MOUSE	93	40
		PAEGRAGEPLVLLAVPG	Q69340_9ALPH	100	37
			Q5PPC8_9ALPH	100	37
			VNUA_SUHVK	100	37
		PPQPPAGGSARRR	Q69340_9ALPH	100	35
			Q5PPC8_9ALPH	100	35
			VNUA_SUHVK	100	35
		PGAGPGGPEDEVTVLGALMES	Q69340_9ALPH	100	49
			Q5PPC8_9ALPH	100	49
			VNUA_SUHVK	100	49
		PGAAGGPGLCRCECCRRRPGPG	Q69340_9ALPH	100	59
			Q5PPC8_9ALPH	100	59
			VNUA_SUHVK	100	59
		ERAPEPVVLGGGGGGQ	Q5PPC8_9ALPH	100	42

			VNUA_SUHVK	100	42
			Q69340_9ALPH	100	38
		RPGPGAGPGGPEDEVTVLGALMESPTGGPGGRGGLV	Q69340_9ALPH	100	85
			Q5PPC8_9ALPH	100	85
			VNUA_SUHVK	100	85
		PERGALAGHVLA AVHGEHA	Q69340_9ALPH	100	45
			Q5PPC8_9ALPH	100	45
			VNUA_SUHVK	100	45
		RGPVGLHGAPGGGADAGLEGCKV	Q5PPC8_9ALPH	100	52
			VNUA_SUHVK	100	52
			Q69340_9ALPH	91	46
		PPAGGSARRRRRGGGPPGRGR	Q5PPC8_9ALPH	100	52
			VNUA_SUHVK	100	52
			Q69340_9ALPH	91	47
		RGPVGLHGAPGGGADAGLEGCKV	Q5PPC8_9ALPH	100	52
			VNUA_SUHVK	100	52
			Q69340_9ALPH	91	46
		PPPPPPQ	VNUA_SUHVK	100	69
		RGPVGLHGAPGGGADAGLEGCKV	Q5PPC8_9ALPH	100	52
			VNUA_SUHVK	100	52
			Q69340_9ALPH	91	46
		PGPRGGLGEPGRGHVGRGEEGRG	Q5PPC8_9ALPH	100	55
			VNUA_SUHVK	100	55
			Q69340_9ALPH	95	52
8	Probable nuclear antigen OS=Suid herpesvirus 1 (strain Kaplan) PE=4 SV=1	RGPVGLHGAPGGGADAGLEGCKV	VNUA_SUHVK	100	52
			Q5PPC8_9ALPH	100	52
			Q69340_9ALPH	91	46
		GAPGPVPGPVRVRRRAEAVGEG	VNUA_SUHVK	100	49
			Q69340_9ALPH	100	49
			Q5PPC8_9ALPH	100	49
		PGARGPRGPVGLHGAPGGGADAGLEGCKVP	VNUA_SUHVK	100	68
			Q5PPC8_9ALPH	100	68
		PGPGAGHRVAHVVLAAEAQRLGPGVQAGEGGL	VNUA_SUHVK	100	70
			Q69340_9ALPH	100	70
			Q5PPC8_9ALPH	100	70
		RGPVGLHGAPGGGADAGLEGCKV	VNUA_SUHVK	100	52
			Q5PPC8_9ALPH	100	52
			Q69340_9ALPH	91	46
		RPGPGAGPGGPEDEVTVLGALMESPTGGPGGRGGLV	VNUA_SUHVK	100	85
			Q69340_9ALPH	100	85
			Q5PPC8_9ALPH	100	85
		RGGGRAPRGGGGPGGGGRAGRGEV	VNUA_SUHVK	100	58
			Q5PPC8_9ALPH	100	58
		PQPPPAGGSARRRRRGGGPPGR	VNUA_SUHVK	100	52
			Q5PPC8_9ALPH	100	52
			Q69340_9ALPH	91	47
		GHGPGRGAVAGRLADVVLVPEPLAGVPGA AV	VNUA_SUHVK	100	68
			Q69340_9ALPH	100	68
			Q5PPC8_9ALPH	100	68
		RPGPGAGPGGPEDEVTVLGALMESPTGGPGGRGGLVLLV	VNUA_SUHVK	100	91
			Q69340_9ALPH	100	91
			Q5PPC8_9ALPH	100	91
		PVGHEREVVVGAALPARGPGLRGRGRGGGGGGGRGPRGRG	VNUA_SUHVK	100	102
			Q5PPC8_9ALPH	100	102
			Q69340_9ALPH	93	96
		QRRGHAAGDEGAVAVGRVDPALAEALVEALVGGL	VNUA_SUHVK	100	67
			Q69340_9ALPH	100	67

			Q5PPC8_9ALPH	100	67
		AGPGGPEDEVTVLGALMESPTGGPGG	Q69340_9ALPH	100	61
			Q5PPC8_9ALPH	100	61
			VNUA_SUHVK	100	61
		PPAGGSARRRRRGGGPPGRGGR	VNUA_SUHVK	100	52
			Q5PPC8_9ALPH	100	52
			Q69340_9ALPH	91	47
		AGRGLADVVLVPEPLAGVPGA	VNUA_SUHVK	100	45
			Q69340_9ALPH	100	45
			Q5PPC8_9ALPH	100	45
		PPPPPPPPQPPP	VNUA_SUHVK	100	38
		EGAVAVGRVDPALAE	VNUA_SUHVK	100	33
			Q69340_9ALPH	100	33
			Q5PPC8_9ALPH	100	33
		GAPGPVPGPVRVRRAEAVGEG	VNUA_SUHVK	100	49
			Q69340_9ALPH	100	49
			Q5PPC8_9ALPH	100	49
		PGARGPRGPVGLHGAPGGADAGLEGGKVP	VNUA_SUHVK	100	68
			Q5PPC8_9ALPH	100	68
		PGPGAGAHRAHVLAEEAQLGPGVQAGEGGL	VNUA_SUHVK	100	70
			Q69340_9ALPH	100	70
			Q5PPC8_9ALPH	100	70
		RGPVGLHGAPGGADAGLEGGKV	VNUA_SUHVK	100	52
			Q5PPC8_9ALPH	100	52
			Q69340_9ALPH	91	46
		RPGPGAGPGPEDEVTVLGALMESPTGGPGGRGGLV	VNUA_SUHVK	100	85
			Q69340_9ALPH	100	85
			Q5PPC8_9ALPH	100	85
		RGGGRAPRGGGGPGGGGRAGRGEV	VNUA_SUHVK	100	58
			Q5PPC8_9ALPH	100	58
			Q69340_9ALPH	89	53
		PQPPAGGSARRRRRGGGPPGR	VNUA_SUHVK	100	52
			Q5PPC8_9ALPH	100	52
			Q69340_9ALPH	91	47
		GHGPRGAVAGRGLADVVLVPEPLAGVPGA	VNUA_SUHVK	100	68
			Q69340_9ALPH	100	68
			Q5PPC8_9ALPH	100	68
		RPGPGAGPGPEDEVTVLGALMESPTGGPGGRGGLVLLV	VNUA_SUHVK	100	91
			Q69340_9ALPH	100	91
			Q5PPC8_9ALPH	100	91
		PVGHEREVVVGAALPARGPGLRGRGRGGGGGGGRGPRGRG	VNUA_SUHVK	100	102
			Q5PPC8_9ALPH	100	102
			Q69340_9ALPH	93	96
		QRRGHAAGDEGAVAVGRVDPALAEVEALVGGL	VNUA_SUHVK	100	67
			Q69340_9ALPH	100	67
			Q5PPC8_9ALPH	100	67
		AGPGGPEDEVTVLGALMESPTGGPGG	Q69340_9ALPH	100	61
			Q5PPC8_9ALPH	100	61
			VNUA_SUHVK	100	61
		PPAGGSARRRRRGGGPPGRGGR	VNUA_SUHVK	100	52
			Q5PPC8_9ALPH	100	52
			Q69340_9ALPH	91	47
		AGRGLADVVLVPEPLAGVPGA	VNUA_SUHVK	100	45
			Q69340_9ALPH	100	45
			Q5PPC8_9ALPH	100	45
		PPPPPPPPQPPP	VNUA_SUHVK	100	38
		EGAVAVGRVDPALAE	VNUA_SUHVK	100	33

			Q69340_9ALPH	100	33
			Q5PPC8_9ALPH	100	33
		PGARGPRGPVGLHGAPGGADAGL	VNUA_SUHVK	100	56
			Q5PPC8_9ALPH	100	56
			Q69340_9ALPH	82	42
			VNUA_SUHVK	100	97
		PPPPPPQPPAGGSARRRRRGGGPPGRGRRRGKKRRRAEG	Q5PPC8_9ALPH	100	97
			Q69340_9ALPH	95	92
			VNUA_SUHVK	100	55
		PGPRGGLGEPGRGHVGRGEEGRG	Q5PPC8_9ALPH	100	55
			Q69340_9ALPH	95	52
			VNUA_SUHVK	100	42
		AGPGRAALLLAPLGRWVRA	Q69340_9ALPH	100	42
			Q5PPC8_9ALPH	100	42
			VNUA_SUHVK	100	56
		QPPPAGGSARRRRRGGGPPGRGGR	Q5PPC8_9ALPH	100	56
			Q69340_9ALPH	92	51
			VNUA_SUHVK	100	42
		ERAPEPVVLGGGGGGGQQ	Q5PPC8_9ALPH	100	42
			Q69340_9ALPH	100	38
			VNUA_SUHVK	100	55
		PPGGGPPSTSSHHHQDPPGG	Q69340_9ALPH	100	55
			Q5PPC8_9ALPH	100	55
			VNUA_SUHVK	100	58
		PRGPVGLHGAPGGADAGLEGGKVP	Q5PPC8_9ALPH	100	58
			Q69340_9ALPH	91	49
			VNUA_SUHVK	100	82
		PGPGVRRRAEAVGEGGEQRREAAAARVPGRARGALGGLG	Q69340_9ALPH	100	82
			Q5PPC8_9ALPH	100	82
			VNUA_SUHVK	100	112
		GEGDRGTAGGEGDRDDPPPPSPRPPPLPPPPPPPPQPPP	Q5PPC8_9ALPH	100	112
			Q69340_9ALPH	95	102
			VNUA_SUHVK	100	64
		PPAGGSARRRRRGGGPPGRGRRRGKKR	Q5PPC8_9ALPH	100	64
			Q69340_9ALPH	93	59
			VNUA_SUHVK	100	50
		PGPGAGHRVAHVLAEEAQLG	Q69340_9ALPH	100	50
			Q5PPC8_9ALPH	100	50
			VNUA_SUHVK	100	55
		PGPRGGLGEPGRGHVGRGEEGRG	Q5PPC8_9ALPH	100	55
			Q69340_9ALPH	95	52
			VNUA_SUHVK	100	54
		PGPGAGPGPPEDEVTVLGALMES	Q69340_9ALPH	100	54
			Q5PPC8_9ALPH	100	54
			VNUA_SUHVK	100	55
		PGPRGGLGEPGRGHVGRGEEGRG	Q5PPC8_9ALPH	100	55
			Q69340_9ALPH	95	52
			VNUA_SUHVK	100	46
		PLAGVPGAADVADAAGRRVGAG	Q69340_9ALPH	100	46
			Q5PPC8_9ALPH	100	46
			VNUA_SUHVK	100	77
		QGPPSTRPPPPQRPPrWPPSPQKISETRAG	Q69340_9ALPH	100	77
			Q5PPC8_9ALPH	100	77
			VNUA_SUHVK	100	52
		PPAGGSARRRRRGGGPPGRGGR	Q5PPC8_9ALPH	100	52
			Q69340_9ALPH	91	47
			VNUA_SUHVK	100	55
		APGPVPGVRRRAEAVGEGGEQR	VNUA_SUHVK	100	55

			Q69340_9ALPH	100	55
			Q5PPC8_9ALPH	100	55
			VNUA_SUHVK	100	68
		GHGPGRGAVAGRGLADVVLVPEPLAGVPGA AV	Q69340_9ALPH	100	68
			Q5PPC8_9ALPH	100	68
			VNUA_SUHVK	100	68
		GHGPGRGAVAGRGLADVVLVPEPLAGVPGA AV	Q69340_9ALPH	100	68
			Q5PPC8_9ALPH	100	68
			VNUA_SUHVK	100	52
		PGRGHVGRGEEGRGVGPGLAG	Q5PPC8_9ALPH	100	52
			Q69340_9ALPH	95	49
			VNUA_SUHVK	100	50
9	Probable nuclear antigen OS=Suid herpesvirus 1 (strain Kaplan) PE=4 SV=1	GPPVLFVVA VA	VNUA_SUHVK	100	50
		PGPGAGAH RVAHVLA AEAQRLG	VNUA_SUHVK	100	50
			Q69340_9ALPH	100	50
		PRGGPSPRGCRGAGRAGGGGRGCG	Q5PPC8_9ALPH	100	50
			VNUA_SUHVK	100	61
		PGPGAGAH RVAHVLA AEAQRLGPGVQAGEGGL	Q5PPC8_9ALPH	100	61
			VNUA_SUHVK	100	70
			Q69340_9ALPH	100	70
		PGPGPEDEVTVLGALMESPTGGPG	Q5PPC8_9ALPH	100	70
			VNUA_SUHVK	100	55
			Q69340_9ALPH	100	55
		GAALAPGPPVLFVVA VAVAVPAEGRAGEPLVLLAVP	Q5PPC8_9ALPH	100	55
			VNUA_SUHVK	100	72
			Q69340_9ALPH	100	72
		GVGP AEALQDEGLLGAIVAAA HGH	Q5PPC8_9ALPH	100	72
			VNUA_SUHVK	100	51
			Q69340_9ALPH	100	51
		PGAAGPGRAALLAPLRWVRAGGGGAGVAGGAGEAGLGAGAG	Q5PPC8_9ALPH	100	51
			VNUA_SUHVK	100	90
			Q69340_9ALPH	100	90
		PPPPSPPPPPPLPP	Q5PPC8_9ALPH	100	90
			VNUA_SUHVK	100	44
			Q5PPC8_9ALPH	100	44
			Q4A2Z7_9PHYC	93	42
			B6PTI0_BRAFL	93	42
		AGDEGAVAVGRVDPALAE LVEALV	Q4A2B5_9PHYC	93	42
			Q69340_9ALPH	93	41
			VNUA_SUHVK	100	48
			Q69340_9ALPH	100	48
		RPGPGAGPGPGPEDEVTVLGALMESPTGGP	Q5PPC8_9ALPH	100	48
			VNUA_SUHVK	100	68
			Q69340_9ALPH	100	68
		VHGGEHALAVGARR	Q5PPC8_9ALPH	100	68
			VNUA_SUHVK	100	32
			Q69340_9ALPH	100	32
		PPPPPPPPQPPP	Q5PPC8_9ALPH	100	32
			Q5ZK52_CHICK	100	38
			Q69340_9ALPH	100	38
			Q5PPC8_9ALPH	100	38
			B9SPF0_RICCO	100	38
			A8IRQ5_CHLRE	100	38
			B6P9Z8_BRAFL	100	38
			VNUA_SUHVK	100	38
			Q2RTE8_RHORT	92	37
			FH10_ORYSJ	92	37
			Q4RS34_TETNG	92	37

			Q4A2U1_9PHYC	92	37
			Q62CV6_BURMA	92	37
			Q2VZ49_MAGMM	92	37
			A9HB01_GLUDA	92	37
			A6UHC7_SINMW	92	37
			A5XY69_BURMA	92	37
			A5JD88_BURMA	92	37
			Q9SBM1_VOLCA	92	37
			Q8L685_VOLCA	92	37
			Q852P0_VOLCA	92	37
			Q4U2V7_CHLRE	92	37
			Q3HTL0_VOLCA	92	37
			Q3HTK4_CHLRE	92	37
			P93797_VOLCA	92	37
			B9FZ58_ORYSJ	92	37
		PPAGGSARRRRRGGGPPGRGG	VNUA_SUHVK	100	50
			Q5PPC8_9ALPH	100	50
			Q69340_9ALPH	91	45
		PGGLAGAGPVHAVAH	VNUA_SUHVK	100	36
			Q69340_9ALPH	100	36
			Q5PPC8_9ALPH	100	36
		PGPRGGLGEPGRGHVGRGEEGRG	VNUA_SUHVK	100	55
			Q5PPC8_9ALPH	100	55
			Q69340_9ALPH	95	52
		PPPPSPPPRPPPLPPPPPPPPQ	Q5PPC8_9ALPH	100	68
			VNUA_SUHVK	100	68
			Q69340_9ALPH	96	64
			P93797_VOLCA	91	61
		PGVPVPGVRRRAEAVGEGG	A6UHC7_SINMW	91	60
			VNUA_SUHVK	100	48
			Q69340_9ALPH	100	48
		HVGVPAEALQDEGLLGA	Q5PPC8_9ALPH	100	48
			VNUA_SUHVK	100	41
			Q69340_9ALPH	100	41
		PGPRGGLGEPGRGHVGRGEEG	Q5PPC8_9ALPH	100	41
			VNUA_SUHVK	100	51
			Q69340_9ALPH	100	51
		RGPVGLHGAPGGADAGLEGGKV	Q5PPC8_9ALPH	100	51
			Q69340_9ALPH	95	48
			VNUA_SUHVK	100	52
		GGRGPRGRGRRRRRWRPGAGEWGAGPDSFV	Q5PPC8_9ALPH	100	52
			Q69340_9ALPH	91	46
			VNUA_SUHVK	100	52
		RGPVGLHGAPGGADAGLEGGKV	VNUA_SUHVK	100	52
			Q5PPC8_9ALPH	100	52
			Q69340_9ALPH	91	46
		RGPVGLHGAPGGADAGLEGGKV	VNUA_SUHVK	100	52
			Q5PPC8_9ALPH	100	52
			Q69340_9ALPH	91	46
		ERGALAGHVLAHVHGEHALAVGARRQRDRGPG	VNUA_SUHVK	100	52
			Q5PPC8_9ALPH	100	70
			Q69340_9ALPH	100	70
		PGRGHVGRGEEGRGVGPGLAG	Q5PPC8_9ALPH	100	70
			VNUA_SUHVK	100	52
			Q5PPC8_9ALPH	100	52
		RGPVGLHGAPGGADAGLEGGKV	Q69340_9ALPH	95	49
			VNUA_SUHVK	100	52
			Q5PPC8_9ALPH	100	52
			Q69340_9ALPH	91	46

		RGPVGLHGAPGGGADAGLEGGKV	VNUA_SUHKV	100	52
			Q5PPC8_9ALPH	100	52
			Q69340_9ALPH	91	46
		GHGPGRGAVAGRGLADVVLVPEPLAGVPAAV	Q69340_9ALPH	100	68
			Q5PPC8_9ALPH	100	68
			VNUA_SUHKV	100	68
	Tyrosine-protein kinase transforming protein Fgr OS=Feline sarcoma virus (strain Gardner-Rasheed) G	VGGLHPRVLQPGHGLAG	Q69340_9ALPH	100	40
			Q5PPC8_9ALPH	100	40
			VNUA_SUHKV	100	40
		GFAGDDAPRAVFPS	FGR_FSVGR	100	33
		VAPEEHPVLLTEAPLNPK	FGR_FSVGR	100	41